

Title	がん治療を目的とした高活性かつ選択的な線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) 阻害剤ASP5878の創出
Author(s)	栗脇, 生実
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98675
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

がん治療を目的とした高活性かつ選択的な
線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)阻害剤
ASP5878 の創出

2024 年

栗脇 生実

目次

序論.....	1
本論	
第一章 SBDD アプローチによる高 FGFR3 酵素選択的阻害剤の獲得	
第一節 ヒット化合物取得とその課題.....	10
第二節 1,3,5-トリアジン、及びピリミジン誘導体の合成.....	14
第三節 合成した化合物のスクリーニング結果とその考察.....	18
第四節 本章のまとめ.....	26
第二章 <i>In vivo</i> 薬理活性を有する FGFR3 酵素阻害剤の獲得	
第一節 汎 FGFR 選択的な酵素阻害化合物の取得とその課題.....	28
第二節 ピリミジン誘導体の合成.....	32
第三節 合成した化合物のスクリーニング結果とその考察.....	35
第四節 リード化合物 57b の薬理評価結果.....	44
第五節 本章のまとめ.....	46
第三章 ADMET の課題を克服した開発候補化合物 ASP5878 の創出	
第一節 リード化合物取得とその課題.....	48
第二節 ピリミジン誘導体の合成.....	51
第三節 合成した化合物のスクリーニング結果とその考察.....	54
第四節 開発候補化合物 80 の高次評価.....	62
第五節 本章のまとめ.....	67
結論.....	69
実験の部.....	73
参考文献.....	121
謝辞.....	130

略語表

本論文において以下に示す略語及び略号を用いた。

ACD	Advanced Chemistry Development
AcOH	acetic acid
ADC	antibody-drug conjugate
ADDP	1,1'-(azodicarbonyl)dipiperidine
ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion
ADP	adenosine diphosphate
ALK	anaplastic lymphoma kinase
<i>aq.</i>	aqueous
Ar	aryl
ATP	adenosine triphosphate
AUC	area under the curve
BAIAP2L1	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2-like protein 1)
BCG	Bacille de Calmette et Guérin
BINAP	2,2'-bis(diphenylphosphino)-1,1'-binaphthyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
<i>n</i> -Bu ₃ P	tri- <i>n</i> -butylphosphine
CL _{int}	intrinsic clearance
CL _{tot}	total body clearance
C _{max}	maximum plasma concentration
conc.	concentrated
<i>m</i> -CPBA	3-chloroperoxybenzoic acid
CRC	concentration-response curves
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
DCE	1,2-dichloroethane
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMAc	<i>N,N</i> -dimethylacetamide
DME	1,2-dimethoxyethane
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGFR	epidermal growth factor receptor
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
E _{HOMO}	highest occupied molecular orbital energy
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

ESI	electrospray ionization
Et	ethyl
Et ₃ N	triethylamine
Et ₂ O	diethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
F	bioavailability
FBS	fetal bovine serum
FDA	Food and Drug Administration
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FLT3	FMS-like receptor tyrosine kinase 3
GC	gemcitabine-cisplatin
h	hour(s)
HATU	<i>O</i> -(7-aza-1H-benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HBA	hydrogen bond acceptor
HBD	hydrogen bond donor
HER	human epidermal growth factor receptor
<i>h</i> ERG	human ether-a-go-go related gene
HOBt	1-hydroxybenzotriazole monohydrate
HRMS	high resolution mass spectra
HTS	high-throughput screening
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration
ICR	Institute of Cancer Research
IPA	isopropyl alcohol
IPE	diisopropyl ether
JP2	2nd fluid for disintegration test in the Japanese Pharmacopeia
LBDD	ligand-based drug design
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry
LogD	distribution coefficient
M	mol/L
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MD	molecular dynamics
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MEK	mitogen-activated protein kinase kinase
MeOH	methanol
min	minute(s)
MS	mass spectra

MsOH	methanesulfonic acid
MVAC	methotrexate-vinblastine-doxorubicin-cisplatin
NaBH(OAc) ₃	sodium triacetoxyborohydride
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaOAc	sodium acetate
NMP	1-methyl-2-pyrrolidone
NTRK	neurotrophic tropomyosin receptor kinase
PAMPA	parallel artificial membrane permeability assay
PBS	phosphate-buffered saline
PD-1	programmed cell death 1
Pd/C	palladium on carbon
Pd(OAc) ₂	palladium(II) acetate
Pd(PPh ₃) ₄	tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0)
PEG	polyethylene glycol
PI ₃ K	phosphatidylinositol 3-kinase
quant.	quantitative yield
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras	rat sarcoma virus
SAR	structure-activity relationship
SBDD	structure-based drug design
SD	sprague-dawley
TACC3	transforming acidic coiled-coil 3
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
vdW	van der Waals
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor 2

序論

1. 膀胱がん治療薬を取り巻く環境

尿路上皮がんの一つに分類される膀胱がんは、泌尿器系がんの中で最も多く認められているがんであり、また世界で 9 番目に多いがんでもあることが知られている¹⁾。膀胱がんは組織学的に非筋層浸潤性、筋層浸潤性、転移性の 3 種類に主に分類される。非筋層浸潤性膀胱がんは 5 年生存率が 70%以上と高いのが特徴ではあるが、がんの再発に加え、筋層浸潤性や転移性膀胱がんへの進行が頻度高く認められている。筋層浸潤性や転移性膀胱がんにおいて、現状の治療法では効果が不十分であり、5 年生存率は 50%以下へと大きく減少する²⁾。

非筋層浸潤性膀胱がんにおける現在の治療法では、まず外科的に膀胱がん組織を切除する。その後、BCG や化学療法剤を経尿道的に投与する。しかしながら、これら治療法ではがんの再発率が高く³⁾、また筋層浸潤性や転移性へと進展する⁴⁾。筋層浸潤性や転移性膀胱がんにおける主な治療法では、膀胱を全摘出した後にシスプラチンの使用を中心とした MVAC 療法(メトトレキサート、ビンブラスチン、ドキソルビシン、シスプラチン)や GC 療法(ゲムシタビン、シスプラチン)といった多剤併用化学療法が施行される。しかしながら、薬効の低さや有害事象の為、投与量を減量せずに薬剤治療が継続できる患者は少なく、十分な生存率改善は認められていない⁵⁾。そのため、膀胱がんでは現治療法より治療効果や安全性が高い分子標的治療薬の登場が望まれている。

その要求を満たすべく、分子標的薬の臨床試験が積極的に進められている。例えば、トラスツズマブ⁶⁾ (抗 HER2 抗体)、ペバシズマブ⁷⁾ (抗 VEGF 抗体)、エルダフィチニブ⁸⁾ (汎 FGFRs 阻害剤)、エンホルツマブ ベドチン⁹⁾ (抗 Nectin4 抗体 ADC)が、膀胱がん、若しくは尿路上皮がんを適応症として、既に薬剤承認を取得している。これら薬剤は臨床試験にて高い効果が報告されているが、事前の遺伝子検査等で細分類された特定の患者のみが対象となっている。一方で、代表的な免疫チェックポイント阻害剤であるペムブロリズマブ(抗 PD-1 抗体)が、転位性尿路上皮がんを適応症として承認されている。その臨床試験においては数例での完全奏功が認められているものの、全奏効率は 14%から 24%に留まっている¹⁰⁾。そのため、膀胱がんを適応症とした分子標的薬の開発には、さらなるニーズがあると考えられる。

ところで、転移性膀胱がんでは肝臓、肺、骨、副腎、小腸、脳へ転移することが知られている¹¹⁾。転移性膀胱がん患者において、転移先臓器での抗がん活性を発揮するためには、膀胱に加えて転移先臓器への薬剤分布が必要となる。これら臓器の中で脳転移の場合は、中枢移行性を有する薬剤が必要となるが、末梢と中枢との境界にある血管脳関門を通過できる分子の性質には制限がある。一般的にモダリティの視点では、抗体や ADC 等の高分子量のモダリティでは中枢移行性が乏しい一方で、低分子モダリティは血管脳関門を通過して脳内への分布が期待できる。したがって、膀胱がん脳転移患者への薬効を示すためには、抗がん活性に加えて中枢移行性を兼ね備えた低分子モダリティでの分子標的治療薬の登場が待ち望まれている。

2. チロシンキナーゼを標的とする低分子阻害剤を取り巻く環境

がん細胞環境における特定のメカニズムを狙った分子標的治療薬は、古典的な化学療法剤と比較して副作用が低減された抗がん剤であり、患者に対する忍容性も高い。そのため、臨床において分子標的薬の使用が増加している。チロシンキナーゼは分子標的薬の主要な創薬標的の1つであり、チロシンキナーゼを標的とした多くの低分子阻害剤が抗がん剤として承認されている¹²⁾。代表的なものとして、ダコミチニブ(EGFR/HER 阻害剤)、ラトロレクチニブとエヌトロレクチニブ(NTRK1/2/3 阻害剤)、ロルラチニブ(ALK 阻害剤)、ペキシダルチニブ(CSF1R 阻害剤)、ギルテリチニブ(FLT3 阻害剤)、テポチニブ(MET 阻害剤)、トリラシクリブ(CDK4/6 阻害剤)等が2018年以降に承認されている¹³⁾。特定の遺伝子背景を有するがん患者にとって、これらの薬剤の治療効果は魅力的である一方で、全てのがん患者に有効な状況ではない。それ故、多様な患者背景に沿った、種々の創薬標的に対する分子標的薬を準備しておくことが大事である。チロシンキナーゼの一つである線維芽細胞成長因子受容体(FGFR)を阻害する薬剤創出を目指した研究は近年盛んに行われており、FGFR 選択的阻害作用を有する複数の化合物について臨床試験が進められている。例えば、FGFR1、2、3 を阻害する AZD4547¹⁴⁾、インフィグラチニブ¹⁵⁾(NVP-BGJ398)、デラザンチニブ¹⁶⁾(ARQ087)、ペミガチニブ¹⁷⁾(INCB054828)、E7090¹⁸⁾、Debio1347¹⁹⁾(CH5183284)、また汎 FGFR 阻害作用を持つエルダフィチニブ²⁰⁾(JNJ-42756493)、ロガラチニブ²¹⁾(BAY1163877)、PRN1371²²⁾、フチバチニブ²³⁾(TAS-120)が知られている(Figure 1)²⁴⁾。また最近では、特定のサブタイプ特異的な FGFR 阻害剤が幾つか見出されており、早期ステージでの臨床試験が進められている²⁵⁾。これらの化合物の中で、エルダフィチニブは局所進行性、及び転移性の尿路上皮がんを適応症として、2019年にアメリカ食品医薬品局(U.S. FDA)による迅速承認を受領している²⁶⁾。さらにはインフィグラチニブとペミガチニブにおいても、尿路上皮がん患者に対する臨床試験にて有効性が報告されている²⁶⁾。これらの知見から、FGFR3 を標的とした治療薬の創出は臨床的意義が確かであり、膀胱がんに対する新たな治療手段として非常に魅力的だと考えられる。さらに直近では、FGFR2 融合遺伝子を有する肝内胆管がんにおいて、複数の FGFR 阻害剤が臨床試験での良好な成績を示し、薬剤承認が取得されている²⁷⁾。そのため FGFR 阻害剤は、種々のがん患者を治療するための有力な標的として注目度が高い。

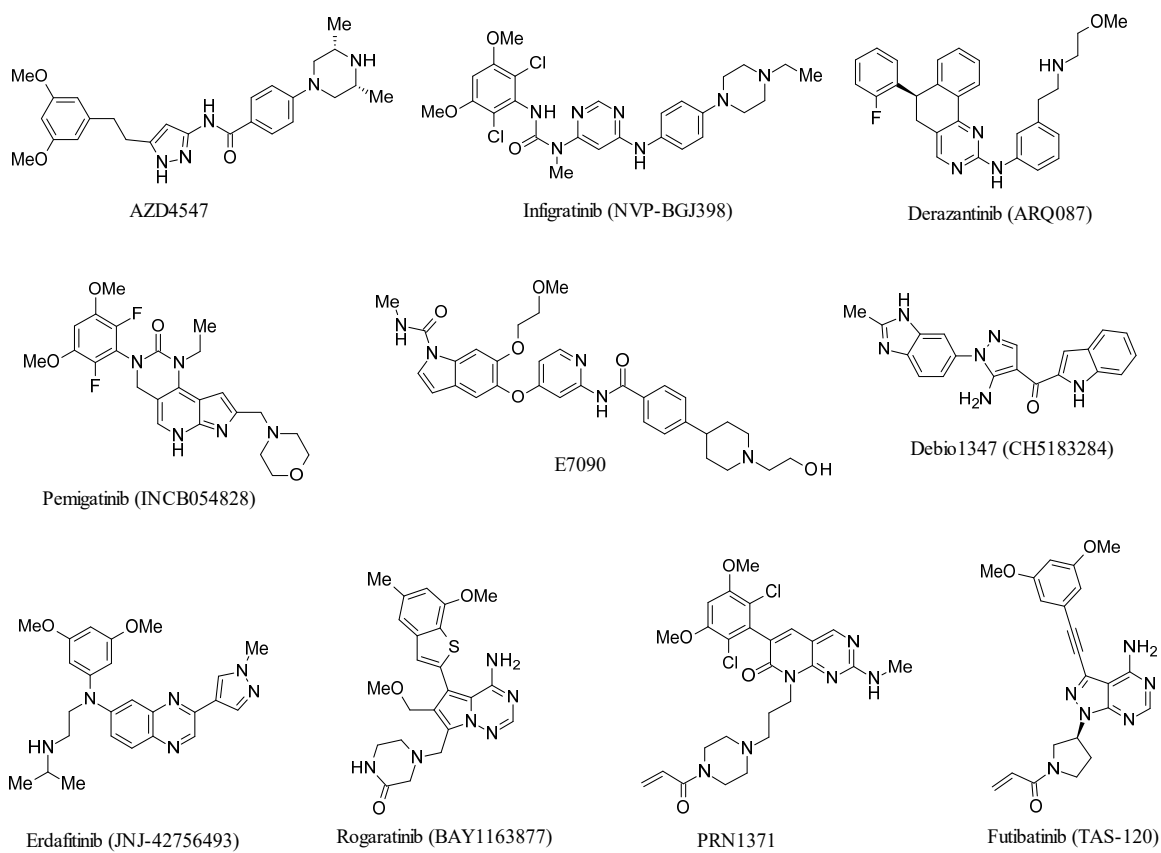


Figure 1. Structure of known FGFR inhibitors examined in clinical studies.²⁴⁾

3. 線維芽細胞成長因子受容体(FGFR)の機能と膀胱がんとの関係性

線維芽細胞増殖因子(FGF)、及びその受容体である線維芽細胞増殖因子受容体(Fibroblast Growth Factor Receptor; FGFR)によるシグナル伝達は、初期発生から器官形成までの発達における最も重要な因子の1つである。ヒトでの FGF 及び FGFR のファミリーとして、18 種類のリガンド、及び 4 つの受容体(FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4)が知られている。すべての FGFR はチロシンキナーゼに分類され、一回膜貫通型の受容体である。FGF が FGFR に結合することで、FGFR の 2 量体化が引き起こされる。この 2 量体化が引き金となって FGFR が自己リン酸化され、下流にある PI₃K-AKT や Ras/Raf/MEK/MAPK といった、細胞増殖に関わるシグナル経路が活性化される。種々のがん患者において、FGF/FGFR シグナルの異常な活性化が生じて制御機構が破綻することで、がん細胞の増殖促進や転移浸潤に加えて血管新生が引き起こされる²⁸⁾。この FGF/FGFR シグナルの異常な活性化は、FGFR 遺伝子の増幅、点変異、転座や FGFR 融合遺伝子等で生じる。これらの遺伝子異常が、肺がん、乳がん、多発性骨髄腫、子宮がん、胃がん、脳腫瘍、胆管がん、尿路上皮がんにおいて認められている²⁹⁾。

近年では膀胱がんの約半数の症例において、FGFR3 の R248C、S249C、G372C、Y375C、K652E といった種々の点変異が活性化遺伝子変異として認められている³⁰⁾。さらに FGFR3 と TACC3、及び FGFR3 と BAIAP2L1 との融合遺伝子が、一部の膀胱がん患者にて発現している³¹⁾。そのため FGFR3 は、その点変異、及び融合遺伝子を有する膀胱がん患者を治療する有力な標的であり、FGFR3 を標的とした新薬創出への期待が高まっている。

4. 酵素阻害活性、及び酵素選択性の獲得

プロテインキナーゼ阻害剤は一般的に、その阻害様式に応じて Type-I から Type-IV の6つに分類される(**Figure 2**)³²⁾。これらの中でも Type-I キナーゼ阻害剤はキナーゼ活性を駆動するアデノシン三リン酸(ATP)と競合するため、この部位を化合物が占有することでキナーゼ自身の酵素活性を減衰させることが可能となる。この背景から Type-I キナーゼ阻害剤の探索は古くから研究が盛んに実行されてきており、医薬品数や研究報告例が非常に多い(**Table 1**)³³⁾。ATP 結合部位には蛋白-化合物間の相互作用が狙い易いポケットが存在しており、このポケットを活用した阻害剤設計は比較的容易に高活性を取得しやすく創薬実現性が高い。ところが ATP はすべてのキナーゼで認識されることから、ATP 結合部位周辺にある ATP のアデニン部分を認識するヒンジ領域はキナーゼ間で完全に保存されている。そのため、ATP 結合部位を利用した阻害剤取得研究においては、当然のことながら特定のキナーゼに対する選択性を獲得するといった観点では実現難易度が高くなる³⁴⁾。その結末として標的選択性が低い化合物が得られた場合には、薬物投与時に主作用が発現するのに加えて他キナーゼ活性も阻害してしまうことにより、副作用が発現する懸念が高まる。続いて、ATP 結合部位を活用しない Type-III や Type-IV などの阻害様式を有する化合物では、特定の酵素に高い選択性を有して結合できる化合物を取得しやすい。その一方で、キナーゼとの高い結合活性を有する化合物の獲得が難しい事や、化合物が酵素に結合しても酵素阻害効果が発現しない等の障壁が伴う。そのため Type-I キナーゼ阻害剤を志向しつつ、標的とするキナーゼに対してヒンジ領域周辺構造の相同性が高い他キナーゼとの選択性をいかに獲得できるかが、創薬研究を実行する上でのキーポイントとなる。

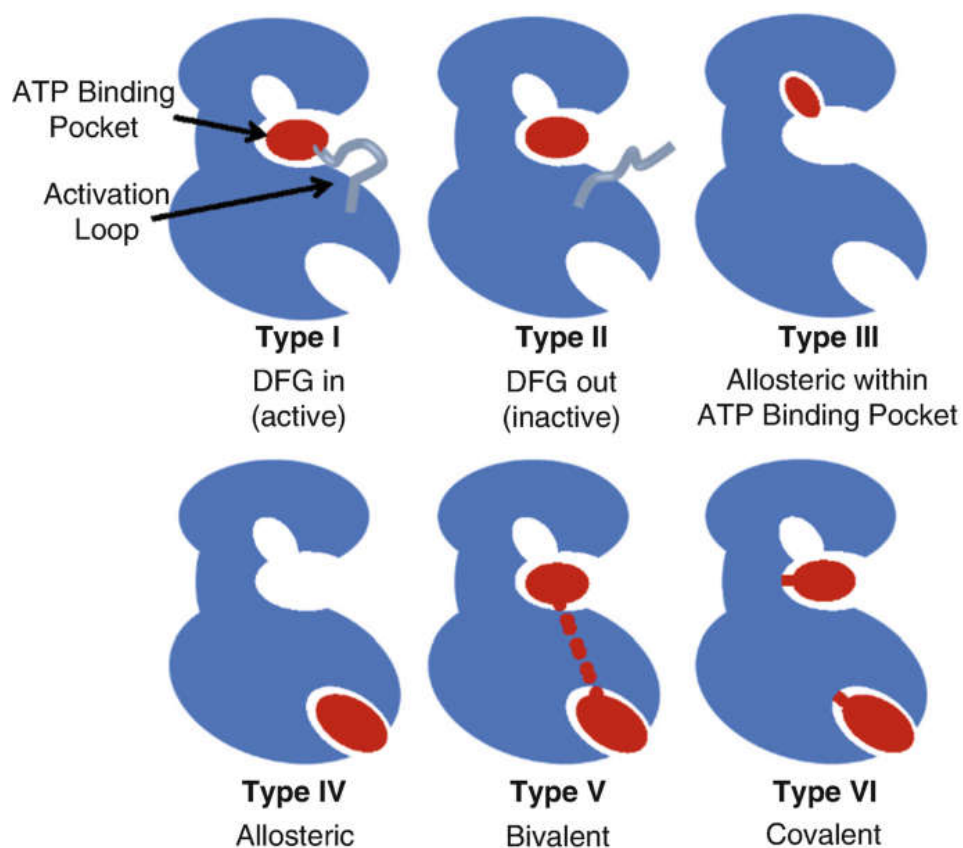


Figure 2. Illustration of six types of kinase inhibitors.³²⁾

Table 1. Classification of kinase inhibitors.³⁵⁾

タイプ	作用部位	代表的な医薬品例
Type-I	ATP 結合部位	ゲフィチニブ エルロチニブ
Type-II	ATP 結合部位+DFG-out 領域	イマチニブ ニロチニブ
Type-III	ATP 結合部位周辺の DFG-out 領域 など	トラメチニブ コビメチニブ
Type-IV	ペプチド基質部位などのアロステリック 部位	-
Type-V	ペプチド基質部位などのアロステリック 部位+ATP 結合部位 の2価相互作用	-
Type-IV	共有結合型の相互作用	アフアチニブ イブルチニブ

主活性や標的選択性を獲得するための化合物デザインは、主に 2 つの創薬手段に分かれる。1 つは structure-based drug design(SBDD)、もう1つは ligand-based drug design(LBDD)と呼

ばれる³⁶⁾。LBDD は、リガンドとなる化合物の構造と薬理活性データによる構造活性相関(SAR)情報を基に化合物をデザインする方法である。LBDD は化合物を最適化するために頻用されるが、あくまでも既存の構造情報の類縁を探索するために劇的な構造変換は期待しにくいデメリットがある。次に SBDD は、標的となる蛋白構造と、それに結合した化合物情報を基にデザインする方法である。SBDD では X 線やクライオ電子顕微鏡等による複合体結晶構造の構造情報が無い場合は、正確な化合物設計が難しいというデメリットがある。一方で視覚的にリガンドと標的蛋白との結合様式を解析することができるため、理論的な化合物設計が実行できる。したがって、標的選択性を獲得したい蛋白間の構造を比較・分析して詳細に考察することで、高い標的選択性を獲得するための戦略が立案可能になる。

5. 本研究の目的

各 FGFR サブファミリーの触媒ドメイン構造は、血管内皮増殖因子受容体 2(VEGFR2)との相同性が高い³⁷⁾。そのことが要因となり、古典的な汎 FGFR 酵素阻害剤は VEGFR2 酵素阻害活性由来と考えられる副作用が臨床試験にて認められている³⁸⁾。例えば、FGFR 酵素阻害剤の代表化合物の一つであるドビチニブ(TKI258、及び CHIR-258)は膀胱がんを適応症の一つとして医薬品開発が進められていたが、その臨床試験が中止された。ドビチニブの臨床試験にて副作用として認められた高血圧が、VEGFR2 酵素阻害活性に因るものだと考えられている³⁹⁾。ドビチニブにおける FGFR3 酵素阻害活性の IC₅₀ 値が 9 nM、一方で VEGFR2 酵素阻害活性の IC₅₀ 値が 13 nM であり、ドビチニブの酵素選択性は 1 倍程度に留まる⁴⁰⁾。

近年の汎 FGFR 酵素阻害剤に目を向けると、尿路上皮がんを適応症として承認されたエルダフィチニブは、FGFR3 酵素阻害活性の IC₅₀ 値が 3.0 nM、VEGFR2 酵素阻害活性の IC₅₀ 値が 36.8 nM であり、その酵素選択性は 12 倍程度に留まる²⁰⁾。一方で、膀胱がん治療を目的として臨床試験が現在進行中のインフィグラチニブ(NVP-BGJ398)と RPN-1371 における、FGFR3 と VEGFR2 との酵素阻害活性の選択性は各々180 倍¹⁵⁾、及び 172 倍²²⁾であり、エルダフィチニブを遥かに超える酵素選択性が獲得できている。

そこで筆者は、VEGFR2 酵素阻害活性の消失した強力な FGFR3 酵素阻害剤は、高血圧等の厳しい副作用が発現しない魅力的な膀胱がん治療薬になると考え、上市済み化合物であるエルダフィチニブを上回る高い FGFR3 酵素阻害活性、及び酵素選択性を有し、且つインフィグラチニブ及び RPN-1371 とは異なる母核構造を有する医薬品候補化合物の創出を目的として創薬研究に着手した。特に重要と考えられる高い標的選択性獲得に向けて、筆者は研究初期段階にて標的蛋白と化合物との複合体構造情報を取得し、SBDD アプローチに基づく理論的な化合物デザインを目指した。

本論

第一章 SBDD アプローチによる高 FGFR3 酵素選択的阻害剤の獲得

第一節 ヒット化合物取得とその課題

ハイスループットスクリーニングによるヒット化合物取得

アステラス所有の大規模化合物ライブラリを用いて、FGFR3 酵素阻害活性評価によるハイスループットスクリーニング(HTS)を実行し、ヒット化合物 **1** を取得した(**Figure 3**)。この化合物 **1** の各酵素阻害活性をプロファイリングしたところ、FGFR1、FGFR2、FGFR3 に対する高い酵素阻害活性を有する一方で、VEGFR2 との酵素選択性は 22 倍に留まり十分な選択性ではなかった(**Table 2**)。そこで、化合物と FGFR3 との複合体構造を基に VEGFR2 との酵素選択性改善を進めるため、化合物 **1** と FGFR3 との共結晶構造の取得を試みたが、共結晶の取得ができなかった。そこで FGFR3 との相同性が高い FGFR2 との共結晶構造を取得し、得られた複合体構造情報を詳細に解析することで SBDD アプローチを実行する計画を立てた。

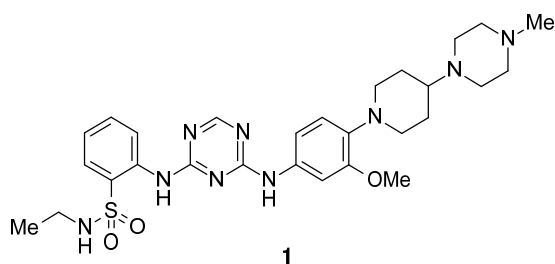


Figure 3. Structure of compound **1**.

Table 2. *In vitro* activity of compound **1**.

Kinase	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4	VEGFR2	Ratio ^a (fold)
IC ₅₀ (nM)	40	5.1	12	682	266	22

^a Ratio of IC₅₀ value of VEGFR2 to that of FGFR3.

ヒット化合物の課題解決に向けた化合物デザイン

HTS ヒット化合物 1 と FGFR2 キナーゼドメインとの複合体の X 線結晶構造の解析結果より、化合物 1 は FGFR2 の ATP 結合部位を占有しており、いわゆる Type-I 阻害剤であることが判明した(Figure 4)。続いて FGFR3 酵素と化合物との結合様式を推測する上で、FGFR2 酵素にて代替できるかを確認した。複合体結晶構造情報から得られた FGFR2 の ATP 結合部位周辺のアミノ酸残基を抽出し、両酵素間でのアミノ酸配列情報を比較したところ、FGFR2 の Ser568(対応するアミノ酸残基は FGFR3 の Ala559)を除く全てのアミノ酸残基が保存されていた。加えて、両酵素間で唯一配列が異なるアミノ酸残基 Ser568 の側鎖部分は、複合体結晶構造上で ATP 結合部位周辺のポケットとは逆の方向を向いていた。著者はこれらの結果から、化合物1と FGFR3 酵素との結合様式を推測する上で、化合物 1 と FGFR2 との複合体結晶構造に基づく解析結果が代替可能と考えた。

結合様式の解析により、2-アミノ-1,3,5-トリアジン部位はヒンジ領域にある Ala567(FGFR3 の Ala558)のアミノ酸主鎖と水素結合を形成していた。さらに、フェニルスルホンアミド部位は Lys517(FGFR3 の Lys508)のアミノ酸側鎖と水素結合を形成していた。これらの特徴的な相互作用情報を基に化合物 1 の構造最適化を進める前提として、FGFR3 酵素阻害活性を維持する目的で 2-アミノ-1,3,5-トリアジン部位、及びフェニルスルホンアミド部位の構造変換を避ける方針を採用した。対照的に、3-メトキシ-4-[4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル]フェニル基は、酵素の外側に該当する溶媒領域に配置されており、特に目立った相互作用を形成していなかった。溶媒領域近傍に位置しているアミノ酸残基の中で、Lys485(FGFR3 の Lys476)のアミノ酸側鎖にあるアミノ基が、水素結合供与体(HBD)として役割を担えると推測した。したがって、Lys476 との相互作用を形成できる化合物は、FGFR3 に対する高い酵素阻害活性を発揮できると予想した。さらに化合物 1 は、バックポケット(ATP 結合サイト内のタンパク奥の疎水性ポケット)周辺に配置されている Met538(FGFR3 の Met529)と Val562(FGFR3 の Val553)等の疎水性アミノ酸残基と1つも相互作用を形成していなかった。特に FGFR3 の Met529 は、VEGFR2 にて対応するアミノ酸残基が Leu889 であることから(Protein data bank の情報を参考にした)、著者は分子設計した化合物と Met529 との相互作用形成は、FGFR3 酵素阻害活性の増強のみならず、VEGFR2 酵素阻害活性との選択性の改善効果が期待できると考えた。

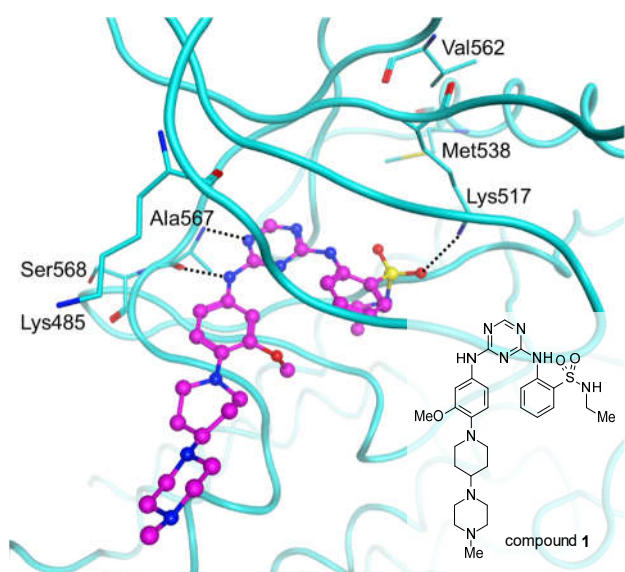


Figure 4. X-ray crystal structure of **1** in complex with FGFR2 (PDB code: 6LVL).

前述の複合体結晶構造による結合様式を基に、化合物をデザインする二つの戦略を立案した。第一に、溶媒領域周辺に配置されている Lys476 側鎖との水素結合を介した相互作用を形成するため、化合物 **1** のベンゼン環上 3'位にアルキルエーテルやカルボニル等の水素結合受容基(HBA)を導入する計画を立てた (Figure 5a の青い円)。複合体構造解析では Lys476 周辺には十分な空きスペースがあるため、化合物 **1** の溶媒領域を占めているベンゼン環は容易に 180 度回転できると予想した。そのため化合物 **1** の 3'位メトキシ基(この酸素原子はあくまでリンカーとして残しており、Lys476 との水素結合獲得は狙ってはいない)が Lys476 へ近づく方向に配置される前提の基、フェニルエーテル構造を土台として置換基を伸長させて各種 HBA を導入する化合物群をデザインした。著者は複合体結晶構造情報から Lys476 側鎖はタンパク質内のアミノ酸間での水素結合を形成しておらずフレキシブルに動くと予想した。そのためドッキングシミュレーションを活用した考察は難しく、リンカーの種類やその長さを最適化して Lys476 側鎖と HBA までの距離を調整する構造活性相関研究が大事だと考えた。

第二に、バックポケット周辺に配置されている Met529 側鎖との疎水性相互作用を形成するためには、化合物 **1** の 1,3,5-トリアジン環の 1 位からバックポケットへアクセスする手段が最も好ましいと考えた。当然のことながら、1,3,5-トリアジン環の 1 位への置換基導入は不可能であるが、複合体構造解析では 1 位の窒素原子が FGFR3 との相互作用に影響を与えていないことから、1,3,5-トリアジン環はピリミジン環へと変換可能である (Figure 5a の赤い円)。バックポケットを占有するため、ピリミジン環の 5 位(トリアジ

ン環での 1 位と同じ位置に相当する)に 3,5-ジメトキシフェニル基を導入する計画を立てた。この置換基は古典的な FGFR 阻害剤として知らせている PD173074 の部分構造である。PD173074 に関する既報の X 線複合体結晶構造解析結果に基づくと、3,5-ジメトキシフェニル基はバックポケットを効率的に占有できる部分構造である (Figure 5b)⁴¹⁾。導入する部分構造に加えて、FGFR3 の Met529 と VEGFR2 の Leu889 との側鎖間の僅かな立体的な違いを化合物に認識させるために、ピリミジン環と 3,5-ジメトキシフェニル基とのリンカー部分の精緻な最適化が必要であると考えた。すなわち、リンカー長への影響が大きい原子数の変換に加えて、影響が僅かなリンカーを構成する原子の種類についても変換する計画を立てた。

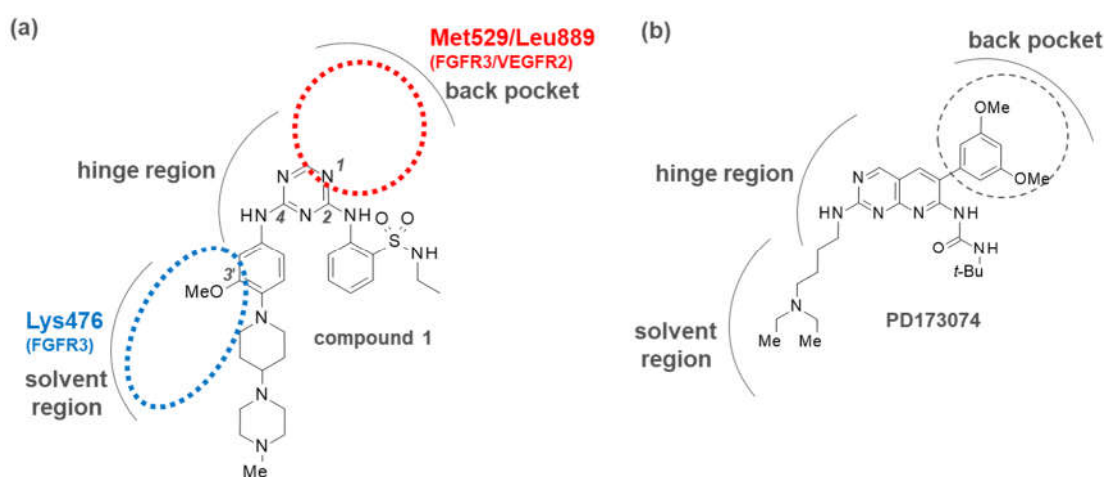
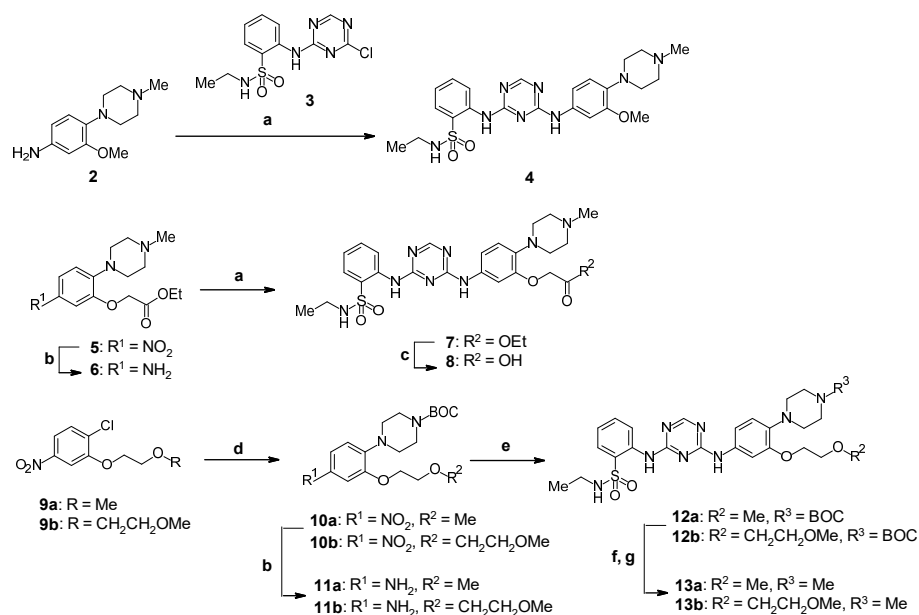


Figure 5. (a) Illustration of representative kinase pockets and targeted amino acid residues with compound 1. (b) Structure of PD173074⁴¹⁾ with the representative kinase pockets.

第二節 1,3,5-トリアジン、及びピリミジン誘導体の合成

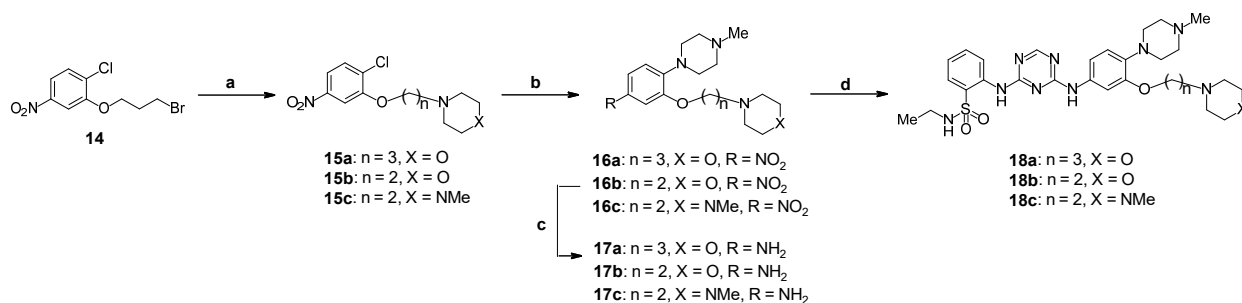
デザインした 1,3,5-トリアジン、及びピリミジン誘導体の合成方法を以下の **Scheme 1-6** に示す。まず、化合物 **4**、**7**、**8**、**13a**、**13b** の合成方法を **Scheme 1** に示す。市販化合物 **2** を、既知化合物 **3**⁴²⁾ と酸性条件下での芳香族求核置換反応(S_NAr 反応)に付すことにより化合物 **4** を得た。化合物 **5**⁴³⁾ のニトロ基を還元して得られた化合物 **6** を、化合物 **3** との S_NAr 反応を施すことにより化合物 **7** へと変換した。続いて、エステル部位の加水分解反応により化合物 **8** を得た。次に、市販化合物 **9a**、**9b** に対し、1-(*tert*-ブトキシカルボニル)ピペラジン部位を導入した化合物 **10a**、**10b** を取得後、ニトロ基の接触水素化により化合物 **11a**、**11b** へと変換した。続いて、既知化合物 **3** との S_NAr 反応に付すことにより得られた化合物 **12a**、**12b** を、*tert*-ブトキシカルボニル(Boc)基の除去と、その後の *N*-メチル化により化合物 **13a**、**13b** へと導いた。



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) **3**, methanesulfonic acid, EtOH, 80 °C or 100 °C, 38–49%; (b) H₂ (1.0 atm), Pd/C, MeOH, room temperature, 72–98%; (c) 10% NaOH *aq.*, EtOH, 80 °C, 42%; (d) 1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperazine, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 15–22%; (e) **3**, DIPEA, NMP, microwave (μW), 120 °C, 36–44%; (f) TFA, CH₂Cl₂, room temperature; (g) 37% HCHO *aq.*, NaBH(OAc)₃, CH₂Cl₂, room temperature, 53–55% (2 steps).

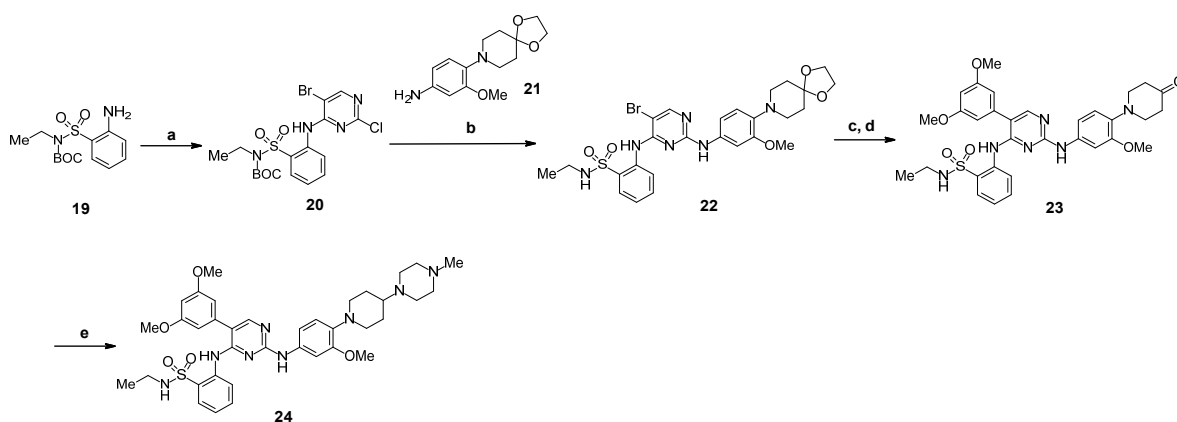
Scheme 2 では化合物 **18a-c** の合成法を示す。化合物 **15a** は、モルホリンを市販化合物 **14** でアルキ

ル化することで準備した。続いて化合物 **15a**、及び市販化合物 **15b**、**15c** に対して、*N*-メチルピペラジン部位を導入して化合物 **16a-c** を得た。これらのニトロ基をヒドラジノー水和物にて還元し、さらに続けて化合物 **3** との S_NAr 反応を施すことにより目的の化合物 **18a-c** を得た。



Scheme 2. Reagents and conditions: (a) morpholine, K_2CO_3 , KI, MeCN, 60 °C, 63%; (b) *N*-methylpiperazine, K_2CO_3 , NMP or DMSO, 150 °C, 41–55%; (c) $FeCl_3$ hexahydrate, hydrazine monohydrate, activated carbon, EtOH/ H_2O , 80 °C or 100 °C, 93–100%; (d) **3**, AcOH, room temperature, 15–31%.

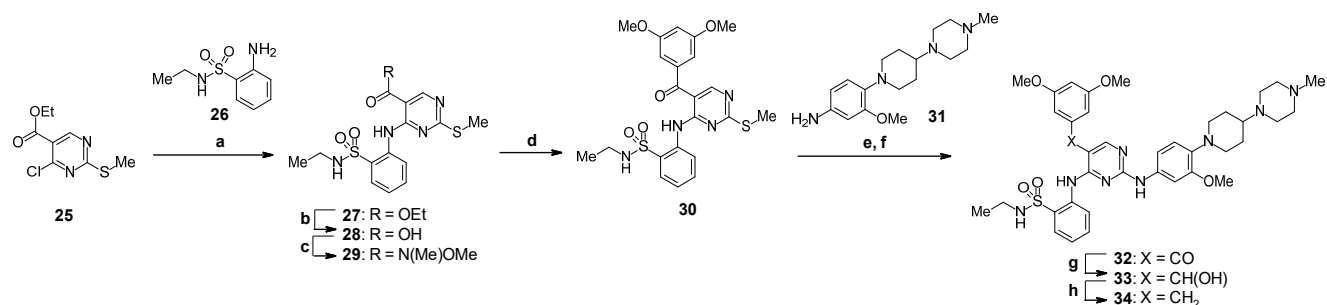
化合物 **24** は、**Scheme 3** に従って合成した。アリールアミン **19**⁴⁴⁾ と 5-ブロモ 2,4-ジクロロピリミジンとの S_NAr 反応⁴⁵⁾ により得られた化合物 **20** を、さらに既知化合物 **21**⁴⁵⁾ との S_NAr 反応に付して化合物 **22** を得た。続いて、3,5-ジメトキシフェニルボロン酸との鈴木カップリング反応により得られる化合物 **23** を経由し、ケタール部位の加水分解、続く *N*-メチルピペラジンとの還元的アミノ化反応を施すことにより目的の化合物 **24** へと導いた。



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) 5-bromo-2,4-dichloropyrimidine, NaH, THF, 50 °C, 28%; (b) **21**, DIPEA, NMP/IPA, μW , 150 °C, 53%; (c) 3,5-dimethoxyphenylboronic acid, $Pd(PPh_3)_4$,

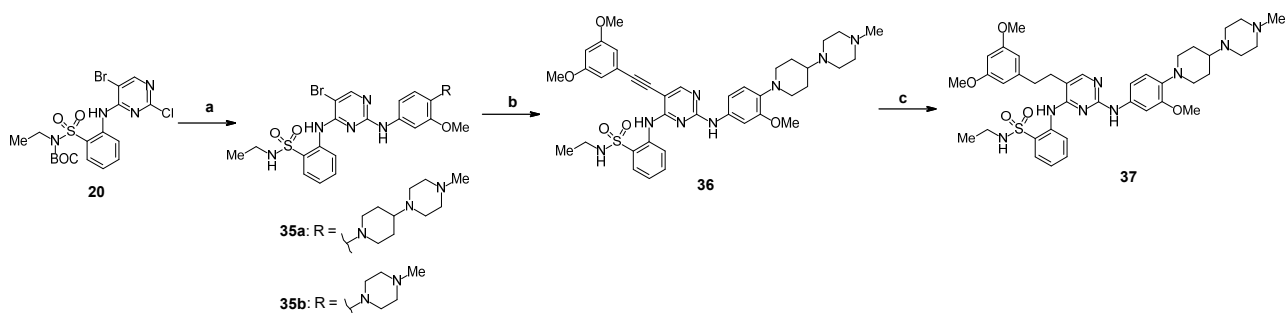
Na₂CO₃, 1,4-dioxane/H₂O, 110 °C; (d) AcOH/H₂O, 100 °C, 100% (2steps); (e) *N*-methylpiperazine, NaBH(OAc)₃, Et₃N, CH₂Cl₂, room temperature, 35%.

化合物 **34** の合成法を **Scheme 4** に示す。両市販化合物 **25** と **26** の S_NAr 反応により取得した化合物 **27** のエステル部分を加水分解して化合物 **28** を得た。続いて得られたカルボン酸を Weinreb アミド⁴⁶⁾ 経由で、グリニヤール試薬を用いて化合物 **30** へと変換した。このスルフィド部位を *m*-CPBA にて酸化してスルホキシドへと変換し、続いて市販化合物 **31** による置換反応により化合物 **32** へと導いた。ケトン部位を水素化ホウ素ナトリウムにて還元して化合物 **33** とし、その後にトリエチルシランによる還元的脱酸素化条件に付して目的の化合物 **34** を得た。



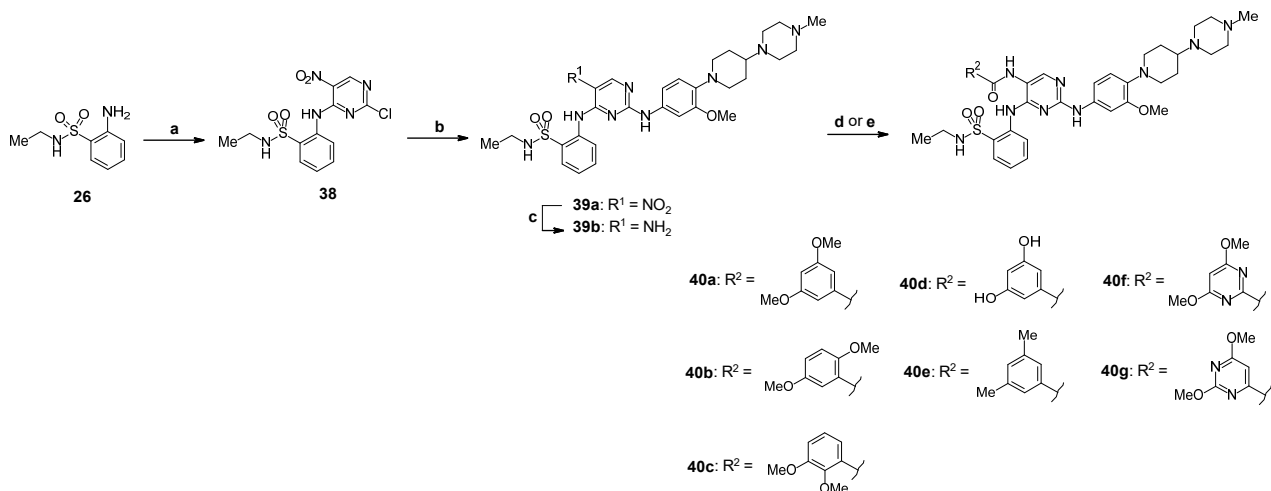
Scheme 4. Reagents and conditions: (a) **26**, DIPEA, NMP, 130 °C, 71%; (b) 1 M NaOH *aq.*, THF/MeOH, room temperature, 81%; (c) *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride, EDCI hydrochloride, HOBT, Et₃N, DMF, room temperature, 96%; (d) 3,5-dimethoxyphenylmagnesium bromide, THF, -78 °C to room temperature, 63%; (e) *m*-CPBA, CH₂Cl₂, room temperature; (f) **31**, IPA, 90 °C, 39% (2 steps); (g) NaBH₄, THF/MeOH, room temperature, 64%; (h) triethylsilane, TFA, CH₂Cl₂, room temperature, 31%.

Scheme 5 では、化合物 **35b** と **37** の合成法を示す。化合物 **31**、**2** と化合物 **20** との S_NAr 反応により化合物 **35a**、**35b** を得た。化合物 **35a** に 1-エチニル-3,5-ジメトキシベンゼンとの菌頭カップリング反応⁴⁷⁾を処すことで化合物 **36** を取得し、続くアルキンリンカー部分の還元反応により目的の化合物 **37** を得た。



Scheme 5. Reagents and conditions: (a) **31** or **2**, methanesulfonic acid, IPA, μW , 130 °C, 73–77%; (b) 1-ethynyl-3,5-dimethoxybenzene, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, Et_3N , DMF, 120 °C, 76%; (c) H_2 (1.0 atm), Pd/C, MeOH/THF, room temperature, 51%.

化合物 **40a–g** は **Scheme 6** に従って合成した。化合物 **26** と 2,4-ジクロロ-5-ニトロピリミジンを $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ 反応に付して化合物 **38** を得た。続いて、化合物 **31** との酸性条件下での $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ 反応により化合物 **39a** を取得した。ニトロ基を還元して得られた化合物 **39b** に対し、生じたアニリン部分を塩化 3,5-ジメトキシベンゾイルによるアシル化、若しくは対応する芳香族カルボン酸ユニットとの縮合反応を施すことにより化合物 **40a–g** へと導いた。



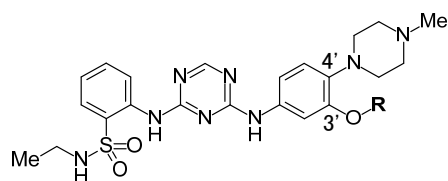
Scheme 6. Reagents and conditions: (a) 2,4-dichloro-5-nitropyrimidine, DMAc, room temperature, 77%; (b) **31**, AcOH, room temperature, 87%; (c) H_2 (1.0 atm), Pd/C, EtOH/THF, room temperature, 99%; (d) 3,5-dimethoxybenzoyl chloride, DIPEA, THF, room temperature, 49% for **40a**; (e) aryl carboxylic acid, HATU, DIPEA, DMF, room temperature, 27% for **40f**.

第三節 合成した化合物のスクリーニング結果とその考察

溶媒領域近傍に位置するアミノ酸 Lys476 との相互作用を狙った戦略

合成した化合物は、ヒトリコンビナント FGFR3、及び VEGFR2 を用い、ADP-Glo luminescent kinase assayにて評価した。Table 3 には、1,3,5-トリアジン誘導体について FGFR3、及び VEGFR2 酵素阻害活性の評価結果を示す。初めに、化合物 1 の 4' 位のアミンユニットが異なる化合物 4 は、化合物 1 と比較して同程度の FGFR3 酵素阻害活性、及び VEGFR2 との選択性を示した。そのため、表中の評価された化合物のアミン部位は、いずれも *N*-メチルピペラジンが置換された化合物を用いた。まず 3' 位の置換基 R として、各 HBA ユニットまでのリンカー長を炭素原子2個で固定し、種々の HBA 導入の効果を確認した。カルボニル基を有する化合物 7(エステル)及び化合物 8(カルボン酸)は元の化合物 4 と比較して FGFR3 酵素阻害活性が減弱した一方で、アルキルエーテルを有する化合物 13a では活性が維持された。そのため HBA としてアルキルエーテル類に焦点を絞り、リンカー長とアルキルエーテルのフレキシビリティを調整した。その結果、化合物 13b(鎖状エーテル)では FGFR3 酵素阻害活性の向上は認められなかった一方で、化合物 18b(環状エーテル)では FGFR3 酵素阻害活性の IC₅₀ 値が 4.1 nM と約 4 倍増強し、VEGFR2 との選択性は 139 倍に広がった。興味深いことに、化合物 18b のモルホリン部位を *N*-メチルピペラジンに変えた化合物 18c や、リンカー長を炭素原子 2 個から 3 個へと変えた化合物 18a では FGFR3 酵素阻害活性が減弱した。

Table 3. SARs of 1,3,5-triazine derivatives.



Compound	R	Enzyme IC ₅₀ (nM)		Ratio ^a (fold)
		FGFR3	VEGFR2	
1	(Figure 3)	12	266	22
4	-Me	15	341	23
7	-CH ₂ CO ₂ Et	62	316	5
8	-CH ₂ CO ₂ H	65	120	2
13a	-CH ₂ CH ₂ OMe	17	310	18
13b		21	550	26
18b		4.1	570	139
18c ^b		15	341	23
18a		63	736	12

^a Ratio of IC₅₀ value of VEGFR2 to that of FGFR3.

^b Tetrahydrochloride salt.

化合物 18b と標的蛋白との複合体結晶構造の取得、及びその考察

化合物 18b と FGFR3 蛋白との結合様式を確認するために、X 線複合体結晶構造解析に着手した。しかしながら、FGFR3 蛋白との共結晶取得は困難であったため、FGFR2 蛋白を代替酵素として用いて検討した。化合物 18b と FGFR2 蛋白との複合体構造の解析結果によると、化合物 18b は化合物 1 と同様に、FGFR2 蛋白のヒンジ領域にある Ala567、及び Lys517 と水素結合を形成していた (Figure 6)。それに加えて、期待した通り FGFR2 蛋白の溶媒領域にある Lys485 のアミノ酸側鎖にあるアミノ基とも弱い水素結合 (3.1Å) を形成していた。著者はこの結果から、FGFR2 蛋白の構造について化合物 18b と化合物 1 を比較すると、Lys485 のアミノ酸側鎖の位置はほぼ変わっておらず、Lys485 のアミノ酸側鎖は

当初予想した高いフレキシビリティを持たないことが分かった。そのため、化合物 **7**、**8**、**13a** では狙っていた Lys485 のアミノ酸側鎖がフレキシブルに動けず、HBA の酸素原子の位置まで近づくためにはリンカー長が足りなかったと考察した。また化合物 **18a** から **18c** の結果から、Lys485 のアミノ酸側鎖との相互作用を形成するためには、アルキルエーテルとして酸素原子の存在とその位置が重要であることが判明した。さらに新たな知見として、化合物 **18b** のモルホリン内のメチレン部位が FGFR2 蛋白の Met497 のアミノ酸側鎖 (FGFR3 蛋白の場合は Met488 に相当する) と疎水的相互作用を形成していた。VEGFR2 蛋白では Glu848 に相当し、親水性アミノ酸側鎖を有するアミノ酸配列となっていることから、同様の疎水性相互作用は弱まると予想した。そのため著者は、モルホリン部位と Lys485 や Met497 との相互作用が要因となり、化合物 **18b** は FGFR3 酵素阻害活性が向上しつつ、VEGFR2 酵素阻害活性との高い選択性を示したと推察した。

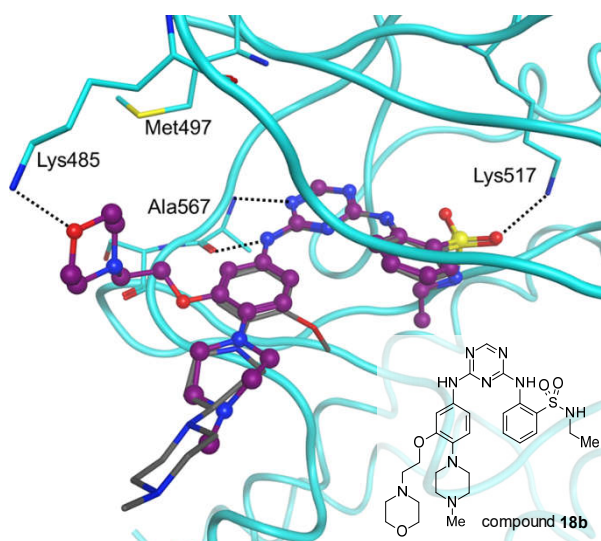


Figure 6. X-ray crystal structure of **18b** in complex with FGFR2 (PDB code: 6LVK). **1** is superimposed and shown as a stick model in gray.

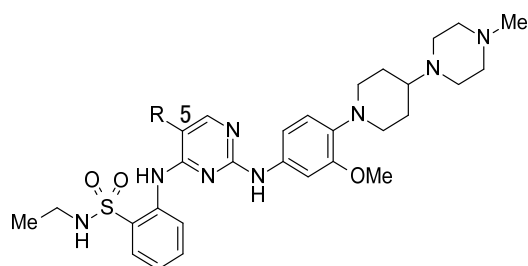
バックポケット近傍に位置するアミノ酸 Met529 との相互作用を狙った戦略

Table 4 には、ピリミジン誘導体について FGFR3、及び VEGFR2 酵素阻害活性の評価結果を示す。母核となるピリミジン環 5 位の位置へ 3,5-ジメトキシフェニル基を導入した化合物 **24** は、FGFR3 酵素阻害活性が 4.1 nM の IC₅₀ 値を示した。元となる化合物 **1** と比較して 3 倍程度の活性向上が認められたが、

VEGFR2 酵素阻害活性との選択性は改善しなかった。続いて、ピリミジン環と 3,5-ジメトキシフェニル基との間にリンカーを導入した化合物群において、メチレン鎖である化合物 **34** では FGFR3 酵素阻害活性が減弱したが、エチレン鎖である化合物 **37** では活性が維持した。加えて、化合物**37**の VEGFR2 酵素阻害活性は IC₅₀ 値が292nM であり、化合物 **24** と比較して 8 倍程度の活性減弱が見られた。さらに興味深いことに、鎖長を維持したままアミドリンカーへと変えた化合物 **40a** では、VEGFR2 酵素阻害活性が顕著に減弱し、FGFR3 酵素阻害活性との酵素選択性は 233 倍以上を示した。

最後に、フェニル基上の置換基効果を確認した。3,5-ジメトキシフェニル基からジメトキシ基の置換位置を変えた化合物 **40b** と **40c**、また置換位置は変えずに置換基をヒドロキシル基やメチル基へと変えた化合物 **40d** と **40e** では、いずれも化合物 **40a** と比較して FGFR3 酵素阻害活性が減弱した。一方でベンゼン環をピリミジン環へと変えた化合物 **40f** と **40g** は、化合物 **40a** と比較して VEGFR2 酵素阻害活性が増強された。これらの結果から、本類縁体においてバックポケットを占有する置換基は、3,5-ジメトキシフェニル基が薬理活性プロファイルの観点で最も好ましい部分構造であった。

Table 4. SARs of pyrimidine derivatives.



Compound	R	Enzyme IC ₅₀ (nM)		Ratio ^a (fold)
		FGFR3	VEGFR2	
24		4.1	38	9
34		>1000	>1000	NC ^b
37		2.8	292	104
40a		4.3	>1000	>233
40b		54	435	8
40c		40	461	12
40d		35	715	20
40e		275	554	2
40f		1.8	131	73
40g		34	227	7

^a Ratio of IC₅₀ value of VEGFR2 to that of FGFR3.

^b Not calculated.

化合物 37 と標的蛋白との複合体結晶構造の取得、及びその考察

化合物 40a を用いた複合体構造取得は困難であったため、その類縁構造である化合物 37 と FGFR3 蛋白との X 線複合体構造の解析結果を Figure 7a に示す。加えて Figure 7b は、今回取得した FGFR3 蛋白と VEGFR2 蛋白(PDB コード 4AG8)⁴⁹⁾とを比較したバックポケット近傍の詳細構造を示している。化合物 1、及び 18b の場合と同様に、化合物 37 は FGFR3 蛋白のヒンジ領域にある Ala558 のアミノ酸主鎖、及び Lys508 のアミノ酸側鎖と水素結合を形成していた(Figure 7a)。それに加えて、計画当初に予想した通り 3,5-ジメトキシフェニル基部分はバックポケットを占有して疎水性相互作用、つまりはポケット周辺を取り巻くアミノ酸側鎖(Glu525、Met529、Ile539、Val553、Val555)との複数のファンデルワールス(vdW)相互作用を形成していた(Figure 7b)。この結果に基づいて考えると、化合物 24 の 3,5-ジメトキシフェニル基はバックポケットの入り口付近に位置するものの、FGFR3 蛋白のバックポケット奥にある Met529 の側鎖まで届いておらず、化合物 24 は FGFR3 酵素に対する VEGFR2 酵素との阻害活性の酵素選択性が向上しなかったと推察した。この考察を深める目的で、化合物 35b(5-ブROMOピリミジン誘導体、Scheme 5 に示す構造)の両酵素阻害活性を追加で確認したところ、IC₅₀ 値が 1.8nM(FGFR3 酵素)、及び 6.6nM(VEGFR2 酵素)であり、極めて低い酵素選択性を示した。化合物 35b と部分構造が類似した 5-ブROMOピリミジン母核を有する類縁体は、時折マルチキナーゼ阻害活性を示すことが過去の研究結果により報告されている⁴⁸⁾。今回の結果は、化合物 24 のピリミジン母核に置換している 3,5-ジメトキシフェニル基がブROMO基と類似の役割を担っており、酵素選択性が獲得できなかったと考えられた。

化合物 37 の 3,5-ジメトキシフェニル基部分は、FGFR3 蛋白の Met529 のアミノ酸側鎖である S δ 原子、C ϵ 原子と vdW 相互作用を形成していた(Figure 7b)。対照的に、この置換基は VEGFR2 蛋白の Leu889 のアミノ酸側鎖である C δ 原子のみと vdW 相互作用を形成していた。このようなバックポケット内での疎水性相互作用、特に Met529 との相互作用形成が、FGFR3 酵素に対する阻害活性を維持しつつ、VEGFR2 酵素に対する選択性を向上させたと考えられる。化合物 40a の酵素選択性は化合物 37 の場合よりも大きかったことから、アミドリンカーがエチレンリンカーよりも自由度が低く、且つ僅かに短いことがその要因であると考えた。この僅かな違いにより、化合物 40a の 3,5-ジメトキシフェニル基部分と

VEGFR2 蛋白の Leu889 との疎水性相互作用が減弱し、この要因で化合物 **40a** の VEGFR2 酵素阻害活性が減弱して高い酵素選択性が獲得できたと予想された。一方で著者は、化合物 **40f** と **40g** は化合物 **40a** と比較して強力な VEGFR2 酵素阻害活性を示したが、この結果はピリミジン環として導入された 2 つの窒素原子がジメトキシ基部分の電子密度を押し下げ、その結果 Leu889 との vdW 相互作用を増強したことが要因であると考察した。

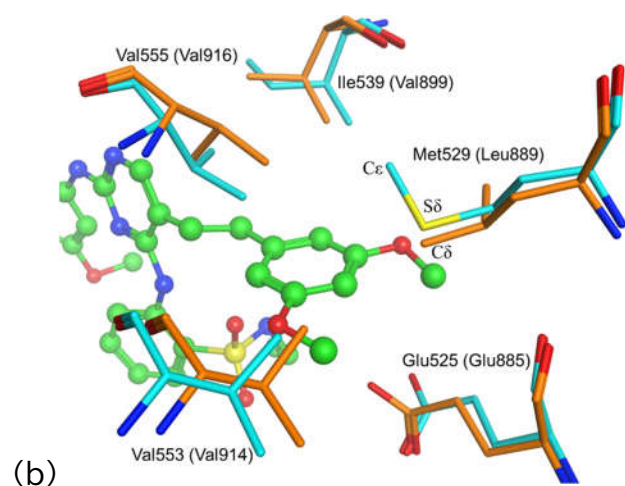
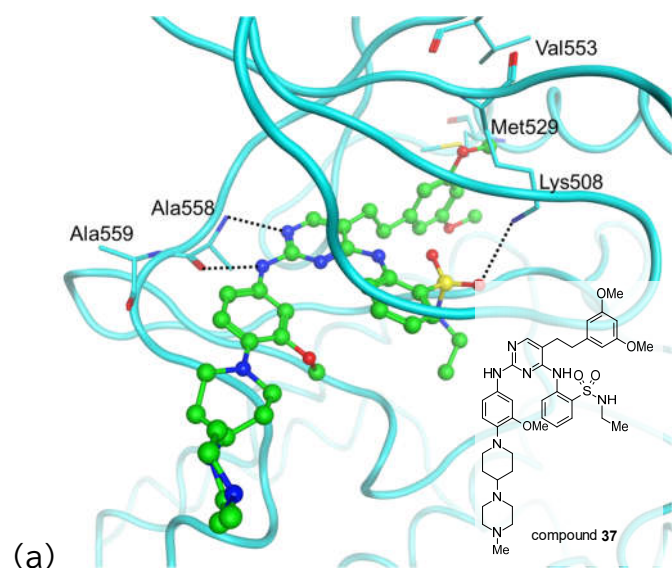


Figure 7. (a) X-ray crystal structure of **37** in complex with FGFR3 (PDB code: 6LVM). (b) The same as (a) with focus on the back pocket. Superimposed structure of FGFR3 and VEGFR2 (PDB code: 4AG8)⁴⁹. Amino acid residues making up the back pocket are shown using a cyan and orange stick model for FGFR3 and VEGFR2, respectively. Residue names of VEGFR2 are shown in parentheses.

注目化合物 40a の追加の薬理評価

化合物 40a は強力な FGFR3 酵素阻害活性と VEGFR2 酵素阻害活性に対する高い酵素選択性を獲得できた。魅力的な活性プロファイルを有することから、著者はこの化合物 40a を注目化合物として選択し、さらなる薬理試験を検討した。化合物 40a は、FGFR 酵素の他のサブファミリーに対して IC₅₀ 値が 2.1 nM (FGFR1)、3.1 nM (FGFR2)、及び 74 nM (FGFR4)の酵素阻害活性を示した。したがってこの化合物は、いずれの FGFR ファミリーに対しても高い活性を持ち、汎 FGFR 酵素阻害作用を有する魅力的な薬理活性プロファイルであると分かった。さらにこの化合物は、ヒト膀胱がん細胞株である UM-UC-14 細胞(FGFR3 酵素を恒常的に活性化させる代表的な点変異の1つとして S249C 変異が知られており、この S249C 変異の FGFR3 酵素が内在的に発現している細胞株)の増殖を、84 nM の IC₅₀ 値で抑制することができた。

第四節 本章のまとめ

本章では、VEGFR2 酵素に対する阻害活性を低下させた新規な FGFR3 酵素阻害剤を探索するため、アステラス所有の大規模化合物ライブラリを用いて、FGFR3 酵素阻害活性評価によるハイスループットスクリーニングを実行し、ヒット化合物 **1** を取得した。化合物 **1** は FGFR1、2、3 に対する酵素阻害活性が強力であったものの、VEGFR2 酵素阻害活性との選択性に乏しかった。そこで化合物 **1** と FGFR2 酵素との X 線複合体構造解析を詳細に解析し、SBDD アプローチにより理論的に VEGFR2 との酵素選択性を拡大させる化合物をデザインするために2つの戦略を立案した。第一に溶媒領域周辺に配置されている Lys476 側鎖との水素結合を介した相互作用を形成すること、第二にバックポケット周辺に配置されている Met529 側鎖との疎水性相互作用を形成することを計画した。

前者のアプローチでは、化合物 **1** のベンゼン環上 3' 位に水素結合受容基を導入し、FGFR3 酵素阻害活性の IC₅₀ 値が 4.1 nM と約3倍増強し、VEGFR2 との選択性は 139 倍に広がった化合物 **18b** を見出した。化合物 **18b** と FGFR2 蛋白との複合体構造の解析結果によると、期待した通り FGFR2 蛋白の溶媒領域にある Lys485 のアミノ側鎖にあるアミノ基とも弱い水素結合(3.1Å)を形成していた。一方で予想に反して、化合物 **18b** のモルホリン内のメチレン部位が FGFR2 蛋白の Met497 のアミノ酸側鎖と疎水的相互作用を形成しており、このことが VEGFR2 酵素阻害活性との高い選択性を示した 1 つの要因と考えられた。

後者のアプローチでは、化合物 **1** の 1,3,5-トリアジン環の 1 位から伸長させた。その結果、バックポケットへアクセスして FGFR3 酵素阻害活性の IC₅₀ 値が 4.3 nM と約3倍増強し、VEGFR2 との選択性は 233 倍以上に広がった化合物 **40a** を見出した。化合物 **40a** の類縁体である化合物 **37** と FGFR3 蛋白との X 線複合体構造解析から、期待した通り 3,5-ジメトキシフェニル基部分はバックポケットを占有し、Met529 のアミノ酸側鎖である S δ 原子、C ϵ 原子と vdW 相互作用を形成していた。対照的に、この置換基が VEGFR2 蛋白の Leu889 のアミノ酸側鎖である C δ 原子のみと vdW 相互作用を形成していることが、VEGFR2 酵素に対する選択性が獲得できた 1 つの要因と予想された。

汎 FGFR 酵素選択的な阻害活性を有する化合物 **40a** は、非常に魅力的な *in vitro* 薬理活性を有する一方で、薬物動態の観点から *in vivo* での薬理活性評価が困難であった。次章では、注目化合物 **40a** から発

展させた最適化研究による、*in vivo* 薬理作用を有するリード化合物の創出について述べる。

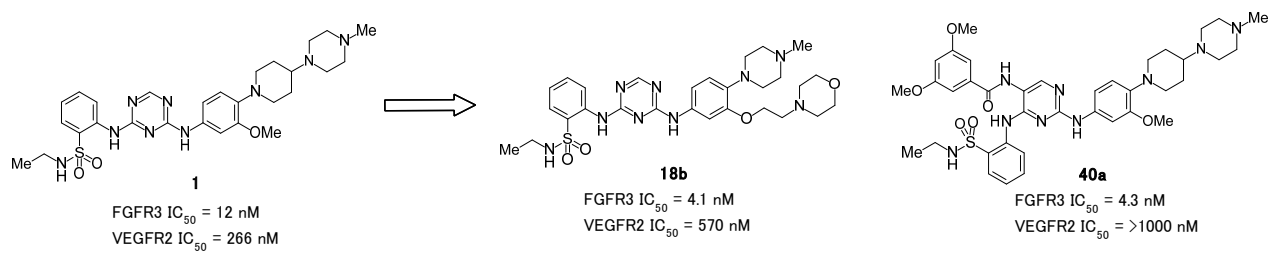


Figure 8. Summary of Chapter 1.

第二章 *In vivo* 薬理活性を有する FGFR3 酵素阻害剤の獲得

第一節 汎 FGFR 選択的な酵素阻害化合物の取得とその課題

前章の背景

第一章では、化合物 **40a**(Figure 9)が VEGFR2 酵素阻害活性 に対して優れた選択性を有し、且つ強力な汎 FGFR 酵素阻害活性を有することを述べた。化合物 **40a** の *in vitro* 細胞増殖阻害活性は、①ヒト膀胱がん細胞 UM-UC-14(S249C 変異の FGFR3 酵素が内在的に発現している細胞株)に対しては IC₅₀ 値が 84 nM、②FGFR3 酵素 S249C 変異蛋白を強制発現させた NIH/3T3 細胞に対しては IC₅₀ 値が 99 nM であった。この結果から本化合物は、FGFR3 に対する高い酵素阻害活性を有するにも拘わらず、酵素活性と細胞活性との間に乖離が認められた。また、Institute of Cancer Research(ICR) マウスに化合物 **40a** を 30 mg/kg 経口投与した 6 時間後の血漿中における化合物濃度は 98.2 nM であった。化合物の血漿中濃度と *in vitro* 細胞活性との関係から考慮すると、膀胱がん異種移植マウスモデルにおいて *in vivo* で強力な抗腫瘍効果を得るためには、*in vitro* 細胞活性と経口投与時の全身曝露の両方を改善する必要がある。そこで、化合物 **40a** の上記の課題点を克服するためにピリミジン誘導体の最適化研究に着手した。

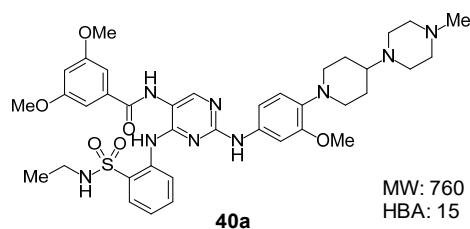


Figure 9. Structure of compound **40a**.

化合物 40a の課題解決に向けた化合物デザイン

まず化合物 40a の経口投与時の全身暴露を改善するための方針を策定するために、薬物動態に関連する各種 *in vitro* 評価によるプロファイリングを実行した。その結果この化合物は、①PAMPA (parallel artificial membrane permeability assay) 試験にて低い膜透過性を示し(1.4×10^{-6} cm/sec)、②JP2 (Japan Pharmacopoeia 2nd fluid) 試験にて低い水溶解性を示し(<1 μ M)、③ICR マウス肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験にて高い *in vitro* CL_{int} (固有クリアランス) 値を示した(>600 mL/min/kg)。著者はこの結果を鑑みて、化合物の脂溶性を調整することにより、相反する性質である膜透過性と水溶解性の両方を同時に向上させることが困難であると判断した。そこで、drug likeness の指標としてよく知られている Lipinski's rule of five⁵⁰⁾を参考にし、特に本ルールから大きく逸脱している二つのパラメータに着目し、分子量(MW)がより低く且つ水素結合受容基(HBA)がより少ない化合物をデザインした。また、本デザインの方向性によって同時に代謝安定性の向上も期待されると考えた。

分子構造のデザイン戦略は、化合物 40a の類似体である化合物 37 と FGFR3 の X 線複合体結晶構造に基づいて以下のように立案した(Figure 10)。まず、この結晶構造から 3 つの部分構造を維持する方針を立てた。①2-アミノピリミジン基; ATP 結合部位のヒンジ領域に位置する Ala558 と 2 つの水素結合相互作用を形成している、②ジメトキシフェニル基; バックポケットの Met529 とのファンデルワールス (vdW) 相互作用を形成している、及び VEGFR2 に対する FGFR の選択性に寄与している、③4-(4-メチルピペラジン-1-イル)ピペリジン-1-イル-ベンゼン基; ギルテリチニブ⁵¹⁾ (FLT3/AXL 阻害剤)、ASP3026⁵²⁾ (EML4-ALK 阻害剤)、ナコチニブ⁵³⁾ (EGFR T790M 阻害剤) などの酵素阻害剤の部分構造として知られており、溶媒領域の占有に適している。一方で *N*-エチル-2-スルファモイル-アニリノ基は、シュガーポケット(酵素活性のエネルギー源となる ATP のリン酸ユニットを認識している)を占有していた。*N*-エチル-2-スルファモイル-アニリノ基は Lys508 との水素結合を形成していたが、これまでに部分構造の最適化は未着手であった。そこで若干の主活性減弱を許容する上で、このユニットを構成するフェニル基を削減して MW を、またスルファモイル基を削減して MW と HBA を各々下げることが計画した。

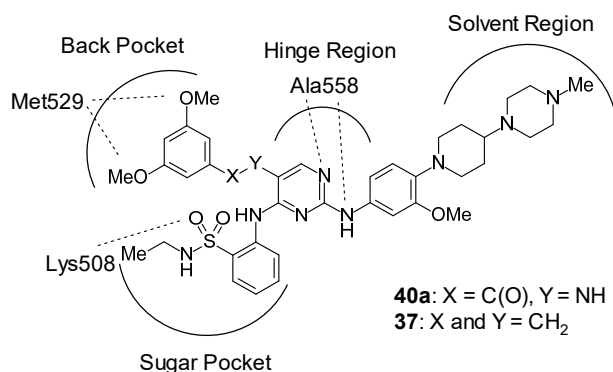


Figure 10. Illustration of representative kinase pockets and amino acid residues with **40a** and **37**.

構造ベースでのより詳細な戦略を **Figure 11** に示す。最初に、化合物 **40a** の *N*-エチル-2-スルファモイル-アニリノ部位 (赤で示された部分構造) について、分子サイズを部分的に削除する、若しくは完全に削除して水素原子置換とする化合物を設計した。次に、3,5-ジメトキシベンゼンとピリミジンの間のリンカー部位 (青で示された部分構造) がスルファモイル基の近傍に位置していたことから、*N*-エチル-2-スルファモイル-アニリノ部位を構造変換することにより 3,5-ジメトキシベンゼン構造の存在位置に影響を与えることが予想された。そのため、リンカー部位における再度の構造最適化が必要になると考えた。リンカー部位が異なる化合物 **37** と化合物 **40a** が同程度の FGFR3 酵素阻害活性を示したことから考慮して、2 原子のリンカー長で構成された種々のリンカー (アミド及びエチレンと構造が類似したリンカー) 導入を計画した。最後に、FGFR 阻害活性の増強を実現した過去の報告¹⁵⁾に従って、3,5-ジメトキシベンゼン部位 (緑で示された部位) にハロゲン原子を導入する計画を立てた。前例ではクロロ基の導入のみが検討されているが、今回著者はクロロ基に加えて新たにフルオロ基を含む組み合わせについてもデザインした。

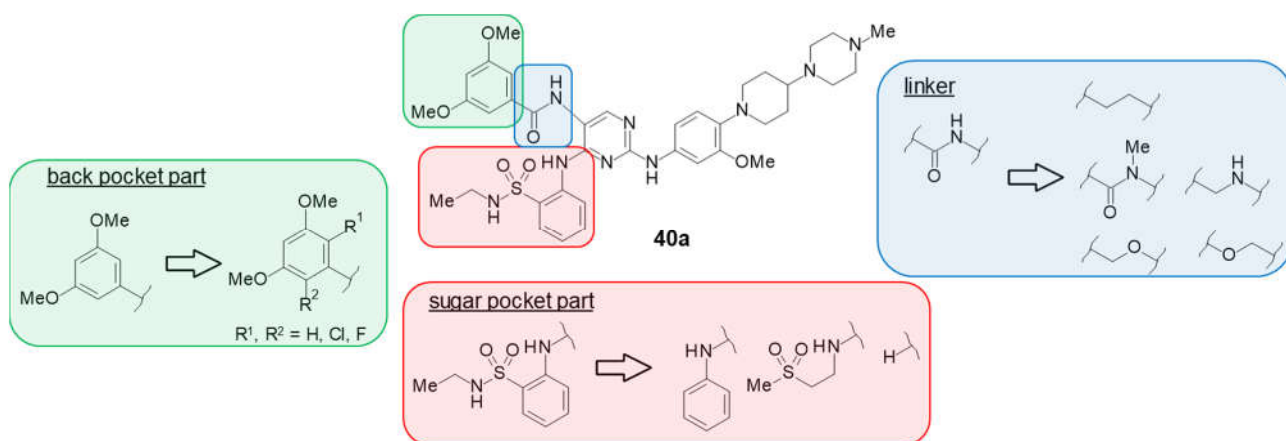
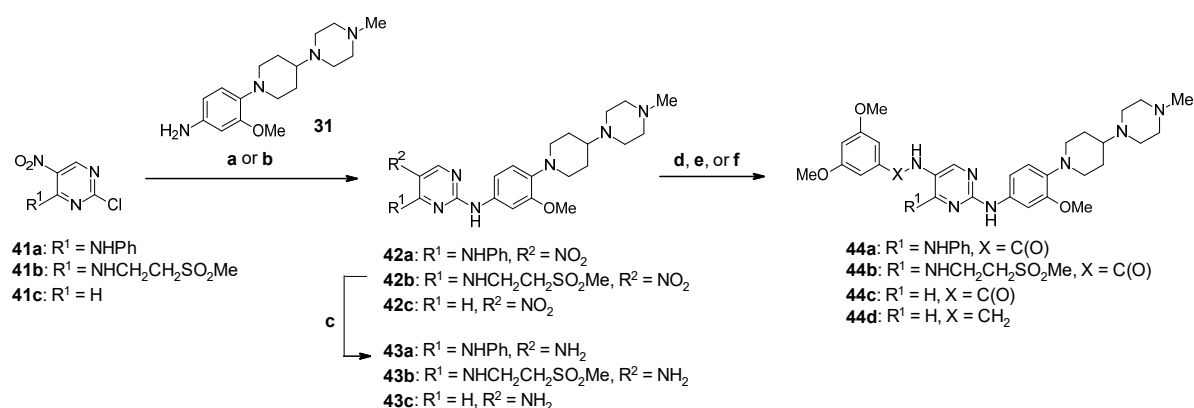


Figure 11. Strategy of structural transformation.

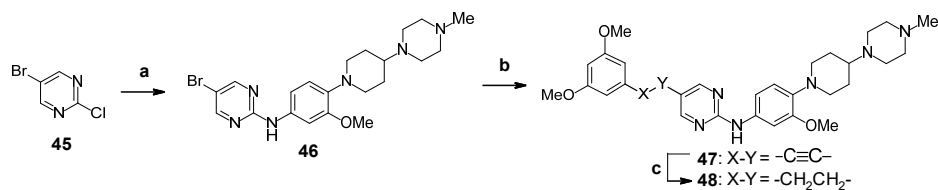
第二節 ピリミジン誘導体の合成

デザインしたピリミジン誘導体の合成方法を以下の **Scheme 7-11** に示す。まず、化合物 **44a-d** の合成方法を **Scheme 7** に示す。化合物 **41a-c** を市販化合物 **31** との酸性条件下での S_NAr 反応に付すことにより化合物 **42a-c** を得た。これらのニトロ基を還元して得られた化合物 **43a-c** と、3,5-ジメトキシベンゾイルクロリドとの反応、若しくは 3,5-ジメトキシ安息香酸との縮合により目的化合物 **44a-c** へと変換した。一方で化合物 **43c** と 3,5-ジメトキシベンズアルデヒドとの還元的アミノ化反応により目的化合物 **44d** を得た。



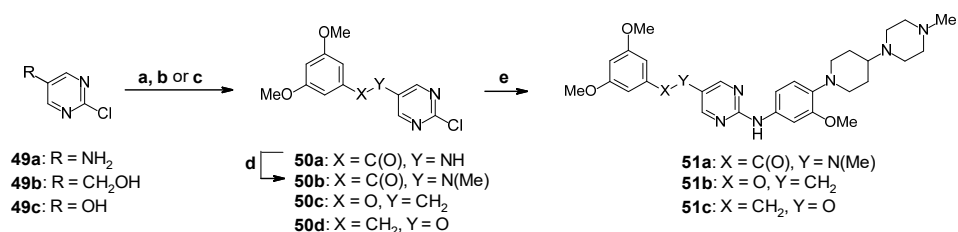
Scheme 7. Reagents and conditions: (a) **31**, AcOH, room temperature, 62–84% for **42a** and **42b**; (b) **31**, MsOH, EtOH, 100 °C, 63% for **42c**; (c) H_2 (1.0 atm), Pd/C, EtOH/THF or EtOH, room temperature, 71–100%; (d) 3,5-dimethoxybenzoyl chloride, DIPEA, THF, room temperature, 30% for **44a**; (e) 3,5-dimethoxybenzoic acid, HATU, DIPEA, DMF, room temperature, 33–51% for **44b** and **44c**; (f) (i) 3,5-dimethoxybenzaldehyde, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, CH_2Cl_2 , room temperature, (ii) NaBH_4 , MeOH, room temperature, 16% (2 steps) for **44d**.

Scheme 8 に化合物 **48** の合成方法を示す。市販化合物 **45** と化合物 **31** との S_NAr 反応により化合物 **46** を取得後、続く菌頭カップリング反応に付すことにより 1-エチニル-3,5-ジメトキシベンゼン部位が置換された化合物 **47** を得た。最後に、このアルキン部位を水素添加反応により還元して目的化合物 **48** へと導いた。



Scheme 8. Reagents and conditions: (a) **31**, MsOH, IPA, 90 °C to 110 °C, 79%; (b) 1-ethynyl-3,5-dimethoxybenzene, Pd(PPh₃)₄, CuI, Et₃N, DMF, 110 °C, 93%; (c) H₂ (3.0 atm), Pd/C, MeOH/THF, room temperature, 54%.

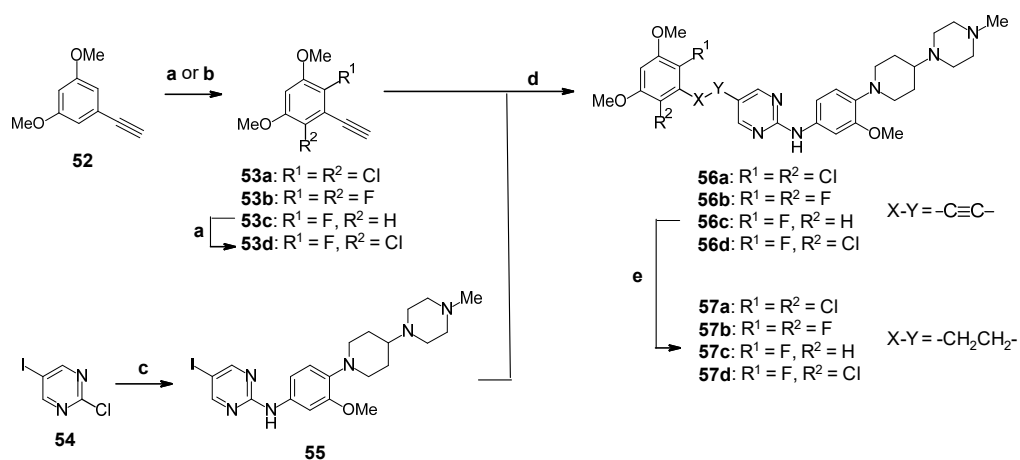
化合物 **51a-c** は **Scheme 9** に従って合成した。化合物 **49a** を 3,5-ジメトキシベンゾイルクロリドとの反応により化合物 **50a** を合成し、そのアミド窒素部分をヨードメタンでメチル化して化合物 **50b** を得た。化合物 **49b** と 3,5-ジメトキシフェノールとの光延反応⁵⁴⁾により化合物 **50c** を合成した。3,5-ジメトキシベンジルブロミドを用いて、化合物 **49c** のフェノール性水酸基をアルキル化して化合物 **50d** を取得した。化合物 **50b-d** は、化合物**31**との Buchwald カップリング反応条件⁵⁵⁾に付すことで目的化合物 **51a-c** へと変換した。



Scheme 9. Reagents and conditions: (a) 3,5-dimethoxybenzoyl chloride, DIPEA, THF, room temperature, 77% for **50a**; (b) 3,5-dimethoxyphenol, ADDP, *n*-Bu₃P, THF, room temperature, 53% for **50c**; (c) 3,5-dimethoxybenzyl bromide, K₂CO₃, DMF, room temperature, 60% for **50d**; (d) iodomethane, NaH, DMF, room temperature, 73%; (e) **31**, Pd(OAc)₂, *rac*-BINAP, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane, 100 °C, 33–82%.

化合物 **57a-d** の合成方法を **Scheme 10** に示す。塩化スルフリルを用いて市販化合物 **52** を塩素化して化合物 **53a** を取得した。一方でセレクトフルオル™を用いて化合物 **52** をフッ素化すると、化合物 **53b**、**53c** がそれぞれ得られた。この化合物 **53c** をさらに塩素化して化合物 **53d** へ導いた。マイクロ波(μW)照射下、市販化合物 **54** と化合物 **31** との S_NAr 反応により化合物 **55** を取得後、これを菌頭カップリング反応に付して化合物 **53a-d** の部分構造を導入して化合物 **56a-d** へと変換した。これらに対して *in-situ*

で発生させたジイミドで処理し⁵⁶⁾、アルキン部分を水素化させて目的化合物 **57a-d** へと導いた。



Scheme 10. Reagents and conditions: (a) SO_2Cl_2 , MeCN, room temperature, 47–83% for **53a** and **53d**; (b) SelectfluorTM, MeCN, room temperature, 20–31% for **53b** and **53c**; (c) **31**, MsOH, IPA, microwave (μW), 130 °C, 83%; (d) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, CuI, DIPEA or Et_3N , DMF, 80 °C or 100 °C, 52–66%; (e) *p*-toluenesulfonyl hydrazide, NaOAc, DME/ H_2O , 110 °C, 24–69%.

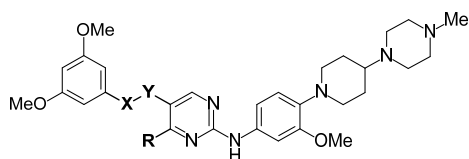
第三節 合成した化合物のスクリーニング結果とその考察

合成した化合物は、ヒト組み換え FGFR3 酵素を用い、ADP-Glo luminescent kinase assay にて評価した。また、いくつかの選択された化合物は、FGFR3 酵素 S249C 変異蛋白を強制発現させた NIH/3T3 細胞を用いた細胞増殖アッセイ(以降は FGFR3 細胞活性と呼ぶ)を用いて評価した。加えてより選択された化合物は、膜透過性、水溶解性、代謝安定性、血漿中濃度、及び FGFR3 酵素の自己リン酸化阻害に対する *in vivo* 薬理活性を評価した。

シュガーポケット占有構造の最適化

Table 5 には、化合物 40a 及び 37 の置換基 R についての構造活性相関を示す。化合物 40a と比較して、化合物 44a-c は 100 倍以上の極めて低い FGFR3 酵素阻害活性を示した。一方で化合物 48 は、化合物 37 と比較して約 9 倍低い FGFR3 酵素阻害活性を示した (IC_{50} 値はそれぞれ 24 nM と 2.8 nM)。また化合物 48 の FGFR3 細胞活性は、化合物 37 の約 10 倍低かった (IC_{50} 値はそれぞれ 324 nM と 34 nM)。続いて物理化学的性質に関して、化合物 44a-c の JP2 溶解性は $\log D_{7.4}$ の低減に伴い改善されたものの、これらの化合物では PAMPA がとても低い結果であった。一方で化合物 48 では、化合物 37 と比較して PAMPA、及び JP2 溶解性が共に改善された。膜透過性は化合物の脂溶性と相関することが一般的に知られているが、今回の場合は化合物 37 から 48 への構造変換では $\log D_{7.4}$ はむしろ低下する方向であった。したがって著者は、化合物 48 における膜透過性の改善は脂溶性の変化ではなく分子量と水素結合受容基の数が大きく低下したことが主な要因であると考察した。

Table 5. Results of optimizing a smaller structure for substituent R.



No	Structure R	Linker		Enzyme FGFR3 IC ₅₀ (nM)	Cellular FGFR3 IC ₅₀ (nM) ^a	PAMPA (10 ⁻⁶ cm/sec) ^b	Solubility (μM) ^c	Log <i>D</i> _{7.4}	MW ^d	HBA ^d
		X	Y							
40a		C(O)	NH	4.3	99	1.4	<1	>3.9	760	15
44a		C(O)	NH	467	NT	0.4	36	3.7	653	12
44b		C(O)	NH	>1000	NT	<0.2	≥100	1.8	683	14
44c	H	C(O)	NH	>1000	NT	<2.9	≥100	2.8	562	11
37		CH ₂	CH ₂	2.8	34	1.8	<1	>4.8	745	13
48	H	CH ₂	CH ₂	24	324	15.1	≥100	3.5	547	9

^a NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C.

^b Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) at pH = 6.5.

^c Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid (JP2) for disintegration test (pH = 6.8 buffer).

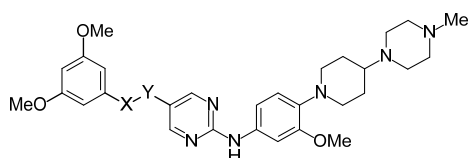
^d MW and HBA values were calculated using ACD/Percepta (ver. 2018.2.5) software.

リンカー部位の最適化

Table 6 には、化合物 48 の 3,5-ジメトキシベンゼン環とピリミジン環との間にあるリンカー-X と Y を変換した構造活性相関を示す。化合物 48 と比較して、化合物 51a、51b、44d は FGFR3 酵素阻害活性が低下したが、化合物 51c だけは同程度の活性を示した。続いて物理化学的特性に関しては、すべての

化合物が良好な JP2 溶解性を示した。一方で、化合物 **44d** と **51c** の PAMPA は化合物 **48** と同程度であったが、化合物 **51b** は、 30×10^{-6} cm/sec 以上まで PAMPA が向上した。膜透過性には分子の極性や表面積などが関与することから、評価化合物群の表面積について MOE⁵⁷⁾ を使って計算した。その結果著者は、今回の化合物 **51b** はその表面積が小さいことが膜透過性での改善効果の一因であると考察した。

Table 6. Results of changing the linker X and Y between the 3,5-dimethoxybenzene and pyrimidine.



No	Linker		Enzyme FGFR3 IC ₅₀ (nM)	PAMPA (10 ⁻⁶ cm/sec) ^a	Solubility (μM) ^b	Log <i>D</i> _{7.4}	Surface area ^c
	X	Y					
48	CH ₂	CH ₂	24	15.1	≥100	3.5	610.2
51a	C(O)	N(Me)	>1000	3.7	≥100	1.8	624.7
51b	O	CH ₂	380	>30.0	≥100	3.4	599.6
44d	CH ₂	NH	78	18.1	≥100	2.9	603.3
51c	CH ₂	O	45	18.5	≥100	3.2	602.0

^a Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) at pH = 6.5.

^b Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid (JP2) for disintegration test (pH = 6.8 buffer).

^c Surface area values were calculated using Molecular Operating Environment (MOE)⁵⁷⁾ software (average of 3 times).

Figure 12 は、化合物 **48** と FGFR3 酵素との複合体の X 線結晶構造の解析結果である。化合物 **37** と FGFR3 酵素との相互作用と同様に、化合物 **48** の 2-アミノピリミジンユニットはヒンジ領域の Ala558 の主鎖と水素結合を形成していた。さらに、3,5-ジメトキシフェニル基はバックポケットのアミノ酸残基 (Met529、Val555、及び Ala634) と疎水的且つ vdW 相互作用を形成していた。これら既知の相互作用に加えて、エチレンリンカー部位は Val486、Ala506、Val555、Leu624、及び Ala634 といったアミノ酸側鎖に囲まれた疎水的な領域に位置していた。著者はこの結果から、化合物 **48** とこれらの疎水性ア

ミノ酸側鎖群との複合的な相互作用により、化合物 **48** が有する酵素阻害活性を維持できたと考察した。加えて、化合物 **48** は Lys517 との水素結合による相互作用が失われたが、主活性に対するネガティブインパクトを前述の疎水性相互作用で補完することができたと推察した。一方で、リンカー部分にいくつかのヘテロ原子を含む他の化合物(**44c**、**44d**、**51a-c**)は、前述したような最適な疎水性相互作用を形成できず、化合物 **48** よりも低い薬理活性に留まったと考えた。したがって薬理活性と物理化学的特性の両面から考慮して、エチレン構造をリンカー部位の最適な構造として選択して次の構造最適化を進めた。

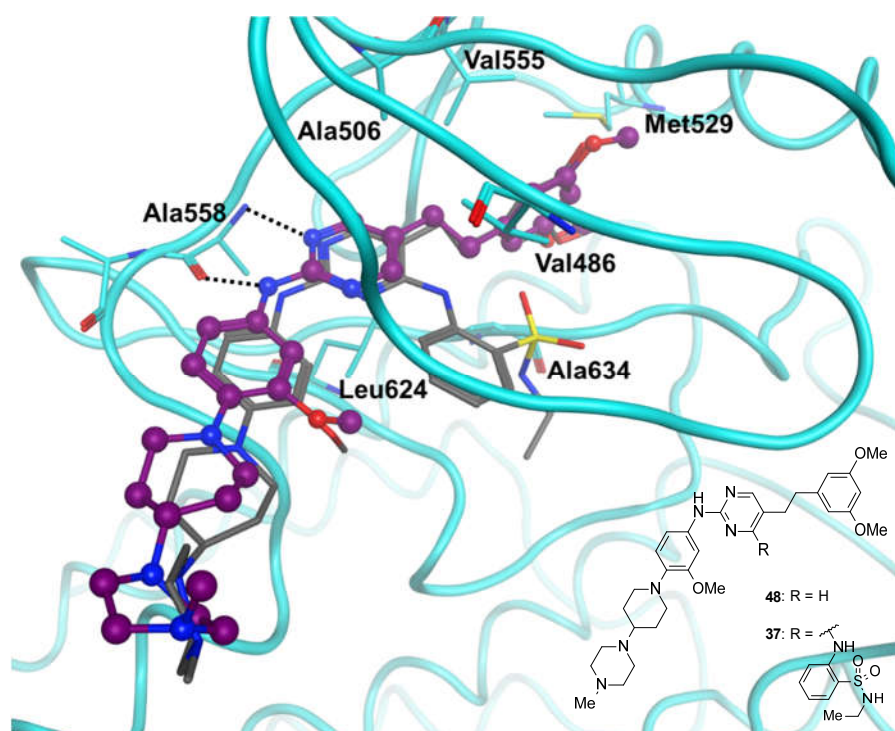
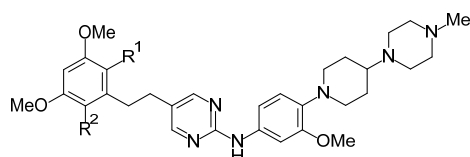


Figure 12. X-ray crystal structure of **48** in complex with FGFR3 (PDB code: 7DHL). **37** is superimposed and shown as a stick model in grey.

Table 7 には、化合物 **48** の 3,5-ジメトキシフェニル基の芳香環上にハロゲン原子を導入した構造活性相関を示す。ジクロロ基を有する化合物 **57a** は、化合物 **48** と比較して約 6 倍増強した酵素阻害活性を示した。一方で化合物 **57a** は、Log $D_{7.4}$ が増加したことにより JP2 溶解性が著しく低下した。続いてジフルオロ基が置換した化合物 **57b** では、約 20 倍の酵素阻害活性、約 25 倍の細胞活性の増強効果が認められた。さらに化合物 **57b** の JP2 溶解性は 79 μM と良好な値を維持できており、経口投与による全身曝露の改善も十分に期待された。フルオロ基とクロロ基を 1 つずつ含む化合物 **57d** は、化合物 **57b** と同

様の高い酵素阻害活性を示したが、JP2 溶解性は化合物 **57a** と同様の低い結果であった。フルオロ基が1つだけ置換した化合物 **57c** は、化合物 **57b** よりも低い酵素阻害活性を示した。この結果から、化合物 **57b** の2つのフルオロ基が強力な酵素阻害活性には重要であることが判明した。Table 7 の全化合物は望ましい Log $D_{7.4}$ を維持できたことから、化合物 **48** と同様の良好な PAMPA の値を示した。これら化合物群においては膜透過性に懸念が無い背景から、酵素阻害活性の増強に伴って FGFR3 細胞活性も増強する結果であった。

Table 7. Results of optimizing substituents R¹ and R² in the 3,5-dimethoxyphenyl unit.



No	Structure		Enzyme FGFR3 IC ₅₀ (nM)	Cellular FGFR3 IC ₅₀ (nM) ^a	PAMPA (10 ⁻⁶ cm/sec) ^b	Solubility (μM) ^c	Log $D_{7.4}$
	R ¹	R ²					
48	H	H	24	324	15.1	≥100	3.5
57a	Cl	Cl	4.3	113	18.7	5	4.4
57b	F	F	1.2	13	18.4	79	3.0
57c	F	H	5.2	95	24.4	≥100	3.2
57d	F	Cl	1.6	31	19.4	12	3.5

^a NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C.

^b Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) at pH = 6.5.

^c Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid (JP2) for disintegration test (pH = 6.8 buffer).

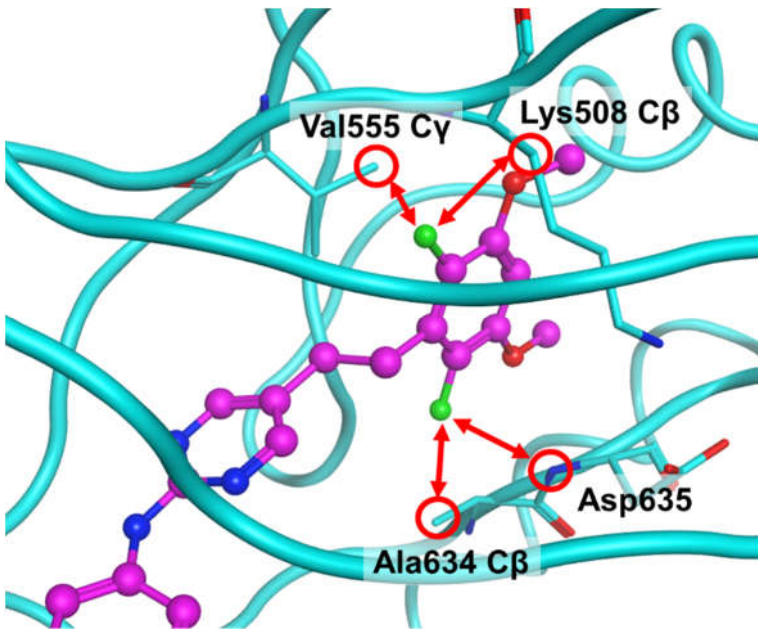
化合物 **57b** と FGFR3 酵素との複合体情報に基づく議論

3,5-ジメトキシフェニル基へのハロゲン原子の導入効果について、過去の報告例¹⁵⁾では、3,5-ジメトキシベンゼン環上へのジクロロ基の導入により、フェニル基の配座が固定されることに起因して主活性が向上する論理が述べられている。一方で著者の結果では、興味深いことにジクロロ基よりもジフルオロ基の導入

がより高活性な結果を与えたことから、前例とは異なる要因で活性が向上したと考えた。そこで、化合物 **57b** に導入された 2 つのフルオロ基の効果を明らかにする目的で、分子動力学(MD)シミュレーションを用いて化合物 **57a** 及び**57b** と FGFR3 酵素との複合体構造を予測した。化合物 **48** と FGFR3 酵素との複合体の X 線結晶構造を鋳型として選択し、GROMACS 法⁵⁸⁾による MD 計算を実施した。まず FGFR3 酵素と結合した化合物 **48**、**57a**、**57b** の各々の分子エネルギーが最小値となる構造を発生させ、MD 計算の出発モデルとして採用した。特に Lys508 の C β 、Val555 の C γ 、Ala634 の C β 、及び Asp635 の主鎖 NH 部位の 4 つの部分構造に焦点を当てて考察した。これらのサイトは、化合物 **57b** のモデル構造において 3,5-ジメトキシフェニル基に置換されたフッ素原子から 4.5Å 以内に位置している(Figure 13a)。

MD シミュレーションにおける前述の4つのアミノ酸残基と R¹/R² の置換基(水素原子/塩素原子/フッ素原子)との間の距離に対する頻度分布を、Figure 13b にヒストグラムとして示す。このヒストグラムから、Lys508 及び Val555 と R¹/R² 置換基との距離の分布は 3 つの化合物の間で類似していることがわかった。これらの結果から、Lys508 及び Val555 との相互作用形成のためには疎水性の高い置換基が有利であることが示唆され、化合物 **57a** と **57b** の酵素阻害活性が化合物 **48** よりも高った理由と合致した。一方で、Ala634、及び Asp635 と R¹/R² 置換基との距離の分布は化合物によって異なっていた。Ala634 については R¹/R² 置換基が小さいほど Ala634 との距離は短くなっていた。この状況から、Ala634 が R¹/R² 置換基との間に立体反発が生じやすい関係にあり、より小さな置換基ほど立体反発が回避されたと予想された。Asp635 については、水素置換やクロロ基の場合よりもフルオロ基にて Asp635 との距離がより短い傾向を示した。著者は、フッ素原子は水素原子や塩素原子よりも電気陰性度が高いため⁵⁹⁾、Asp635 の主鎖 NH 部分は水素結合を介してフッ素原子と相互作用を形成したと考えた⁶⁰⁾。この事象は、化合物 **57b** が化合物 **48** や **57a** と比較して、酵素阻害活性が向上した理由の 1 つであると推察した。ところで、化合物 **57d** は化合物 **57b** と同程度の酵素阻害活性を示したが、化合物 **57c** は化合物 **57b** よりも活性が低下した。これらの結果から、化合物 **57d** のフルオロ基は化合物 **57b** と同様に Asp635 と相互作用し、さらにクロロ基は Lys508/Val555 と相互作用していると推測した。化合物 **57c** のフルオロ基は、Ala634/Asp635 または Lys508/Val555 のいずれかとのみ相互作用したと考察した。

(a)



(b)

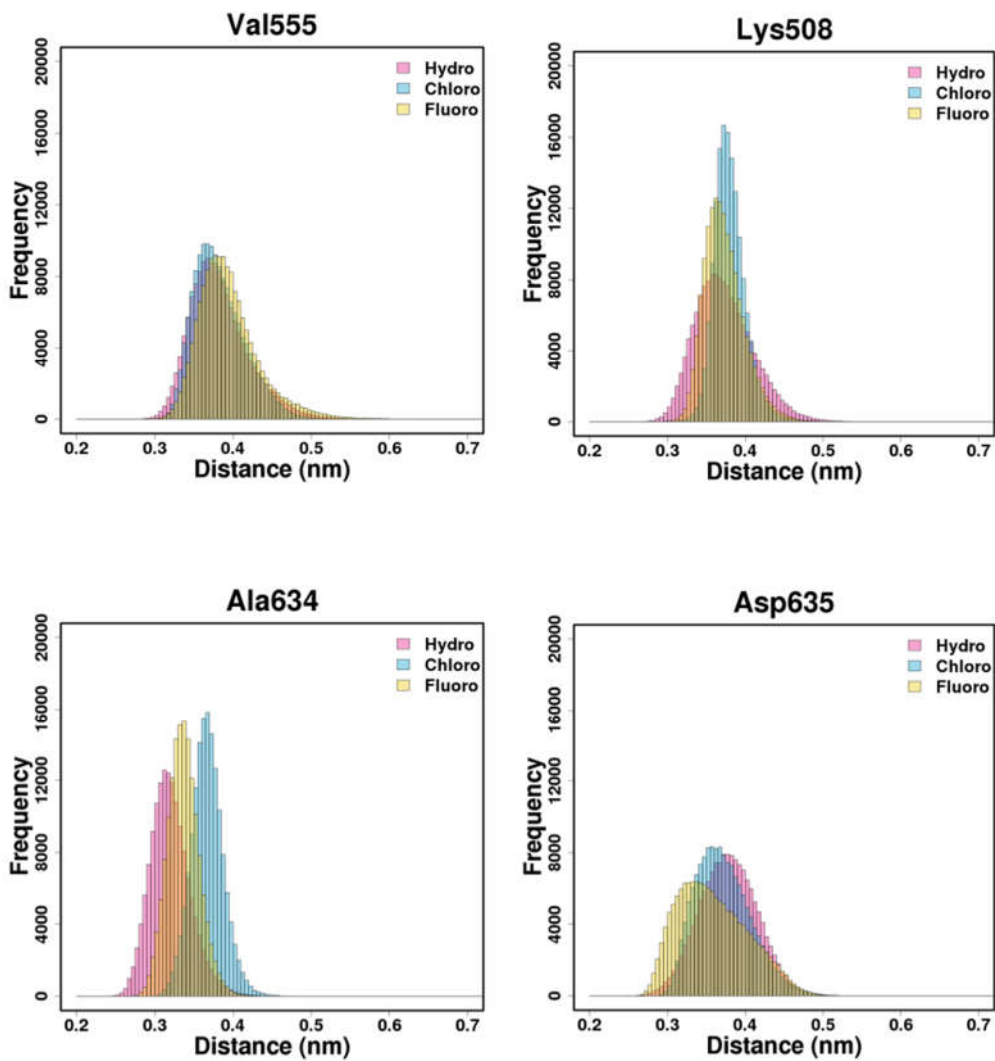
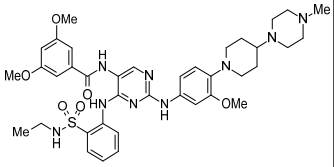
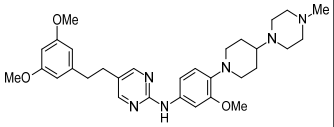
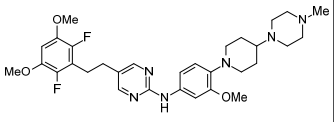


Figure 13. Molecular simulations of **48**, **57a**, and **57b**. (a) The complex structure of **57b** docked with FGFR3 around the back pocket, and amino acid residues located within 4.5 Å of the fluorine atoms. (b) Frequency distribution of distances between the amino acid residues and R¹/R² substituents in an MD simulation.

マウスを用いた *in vivo*での薬理評価

Table 8 には、被験物質を 30 mg/kg 経口投与した時の血漿中濃度、及びその時の FGFR3 自己リン酸化阻害活性、さらには ICR マウスの肝ミクロソームとインキュベートした時の *in vitro* 肝固有クリアランス値を示している。血漿中濃度は、ICR マウスへ化合物を投与して 6 時間後に採血し LC-MS/MS を用いて測定した。腫瘍中での FGFR3 自己リン酸化は、FGFR3 酵素 S249C 変異蛋白を強制発現させた NIH/3T3 細胞を異種移植したヌードマウスを用い、化合物を投与して 6 時間後に腫瘍を採材してサンドイッチ ELISA 法により測定した。その結果、化合物 **48** と **57b** は共に化合物 **40a** よりも全身曝露が 11 倍以上と大きく改善されており、加えて *in vitro* 代謝安定性も改善して低い値を示した。化合物 **48** と **57b** の血漿中濃度が高かった要因として、膜透過性や水溶解性といった物理化学的性質が改善されたことに加えて、代謝安定性も改善されたためであると考察した。続いて、*in vivo* 薬理活性については、化合物 **48** と **57b** は各々 21% 及び 85% の FGFR3 リン酸化阻害活性を示した。化合物 **57b** は化合物 **48** よりも *in vivo* で強力な薬理活性を示した結果から鑑みて、化合物 **57b** の有する強力な細胞増殖阻害活性が *in vivo* での薬理効果発現には必要であった。

Table 8. Plasma concentration, *in vivo* inhibitory activity against FGFR3 phosphorylation, and *in vitro* metabolic stability.

No	Structure	Plasma conc. (nM) ^a	<i>p</i> -FGFR3 (% inh.) ^b	<i>mCL</i> _{int} (mL/min/kg) ^c	Cellular FGFR3 IC ₅₀ (nM) ^d	PAMPA (10 ⁻⁶ cm/sec) ^e	Solubility (μM) ^f
40a		98.2	NT ^g	>600	99	1.4	<1
48		1120	21	227	324	15.1	≥100
57b		1220	85	176	13	18.4	79

^a Plasma concentrations were measured using LC-MS/MS 6 h after single oral administration of test compounds at 30 mg/kg to ICR mice (average of 3 mice).

^b *In vivo* inhibition rate of FGFR3 phosphorylation in nude mice xenografted with NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C 6 h after single oral administration of test compounds at 30 mg/kg (average of 3 mice).

^c *In vitro* intrinsic clearance in ICR mouse liver microsomes.

^d NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C.

^e Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) at pH = 6.5.

^f Aqueous solubility in the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid for disintegration test (JP2: pH = 6.8 buffer).

^g Not tested.

第四節 リード化合物 57b の薬理評価結果

高い血漿中濃度や *in vivo* での強力な薬理活性等の化合物 57b の有望な特徴を考慮して、追加の薬理評価を実行した (Table 9)。化合物 57b は、他の FGFR のサブタイプに対しても FGFR3 と同程度の強力な酵素阻害活性を示し、魅力的な薬理活性プロファイルであることが分かった。さらに化合物 57b は、ヒト膀胱がん細胞株 UM-UC-14 (S249C 変異の FGFR3 酵素が内在的に発現している細胞株) に対して強力な細胞増殖阻害活性を示し、その IC₅₀ 値は 21 nM であった。

Table 9. *In vitro* pharmacological profiles of 57b.

Enzyme IC ₅₀ (nM)				Cellular IC ₅₀ (nM)	
FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGFR4	UM-UC-14	NIH/3T3 (FGFR3 S249C)
1.7	1.2	1.2	4.2	21	13

最後に、UM-UC-14 膀胱がん細胞株を異種移植したヌードマウスモデルを用いて、*in vivo* 抗腫瘍試験を評価した (Table 10)。化合物 57b (0.1、0.3、1、3、及び 10 mg/kg) を投与溶媒 (0.5%メチルセルロース溶液) に懸濁し、マウスに 1 日 1 回、11 日間経口投与した (各群において平均 5 匹のマウスを使用)。0.3 mg/kg (48%の抑制作用) 及び 1 mg/kg (62%の抑制作用) の用量で腫瘍サイズの増殖抑制効果が、3 mg/kg (42%の退縮作用) 及び 10 mg/kg (75%の退縮作用) の用量で腫瘍サイズの退縮効果が、いずれも用量依存的に観察された。著者は、これらの薬理学的結果から鑑みて化合物 57b は膀胱がん患者の治療に向けた有望なリード化合物であると結論付けた。

Table 10. *In vivo* antitumor efficacy of once daily oral administration of **57b** for 11 days in a nude mouse model xenografted with UM-UC-14 bladder cancer cells (average of 5 mice).

Dose (mg/kg)	0.1	0.3	1	3	10 ^a
Antitumor effect	1.4% inh.	48% inh.	62% inh.	42% reg.	75% reg.

^a Body weight loss was observed.

第五節 本章のまとめ

本章では、第一章で得られた化合物 **40a** が *in vivo* で薬理活性を示すためには、細胞活性や全身暴露の低さが課題として浮き彫りとなり、課題克服に向けてピリミジン誘導体の最適化研究に着手した。特に物理化学的性質や代謝安定性を獲得するために、Lipinski's rule of five のルールから大きく逸脱している二つのパラメータに着目し、分子量(MW)がより低く、水素結合受容基(HBA)がより少ない化合物をデザインした。

分子構造のデザイン戦略は、化合物 **37** と FGFR3 の X 線複合体結晶構造に基づいて立案した。FGFR3 蛋白のシュガーポケットを占有している *N*-エチル-2-スルファモイル-アニリノ基を水素原子へと置き換えた化合物 **48** は、基準となる化合物と比較して 10 倍前後の FGFR3 酵素阻害活性、及び細胞活性の僅かな減弱を認めただけで、PAMPA や JP2 溶解性が共に改善された。続いて化合物 **48** の 3,5-ジメトキシベンゼン環とピリミジン環との間にあるリンカーを変換したところ、エーテルリンカーを有する化合物 **51c** が化合物 **48** と同程度の活性及び物理化学的特性を示した。化合物 **48** と FGFR3 酵素との複合体の X 線結晶構造の解析結果では、ヒンジ領域やバックポケットのアミノ酸残基との相互作用の形成に加えて、エチレンリンカー部位が周辺の疎水性アミノ酸側鎖群との複合的な相互作用を形成していた。さらに化合物 **48** の 3,5-ジメトキシフェニル基部位にハロゲン原子を導入したところ、ジフルオロ基が置換した化合物 **57b** では約 20 倍の酵素阻害活性、約 25 倍の細胞活性の増強効果が認められた。その上 JP2 溶解性は 79 μ M と良好な値を維持できており、経口投与による全身曝露の改善も十分に期待された。

化合物 **57b** に導入された 2 つのフルオロ基の効果を明らかにする目的で、分子動力学(MD)シミュレーションに着手したところ、フルオロ基の近傍には4つのアミノ酸残基が配置されていることが分かった。これらの内 Asp635 の主鎖 NH 部位に対しては、水素置換やクロロ基の場合よりもフルオロ基にて Asp635 との距離がより短い傾向を示した。フッ素原子は水素原子や塩素原子よりも電気陰性度が高いため、Asp635 の主鎖 NH 部分は水素結合を介してフッ素原子と相互作用を形成していることが示唆され、化合物 **57b** にて酵素阻害活性が向上した理由の 1 つであると予想した。

最適化研究の成果として得られた化合物 **57b** は高い酵素阻害活性、細胞活性、加えて良好な膜透過性、水溶解性、代謝安定性を示しており魅力的なプロファイルを有していた。これらに加えて、*in vivo* にてマウス

での高い血漿中濃度や、その時の腫瘍細胞内での高い FGFR3 自己リン酸化阻害活性が認められた。さらには、UM-UC-14 膀胱がん細胞株を異種移植したヌードマウスモデルを用いた *in vivo* 抗腫瘍試験にて、0.3、1 mg/kg の用量で腫瘍サイズの増殖抑制効果が、3、10 mg/kg の用量で腫瘍サイズの退縮効果が、いずれも用量依存的に観察された。

化合物 **57b** は膀胱がん患者の治療に向けた有望なリード化合物であると結論付けた。次章では、化合物 **57b** の薬物動態、及び安全性の観点での課題克服を目的とした最適化研究による、開発候補化合物の創出について述べる。

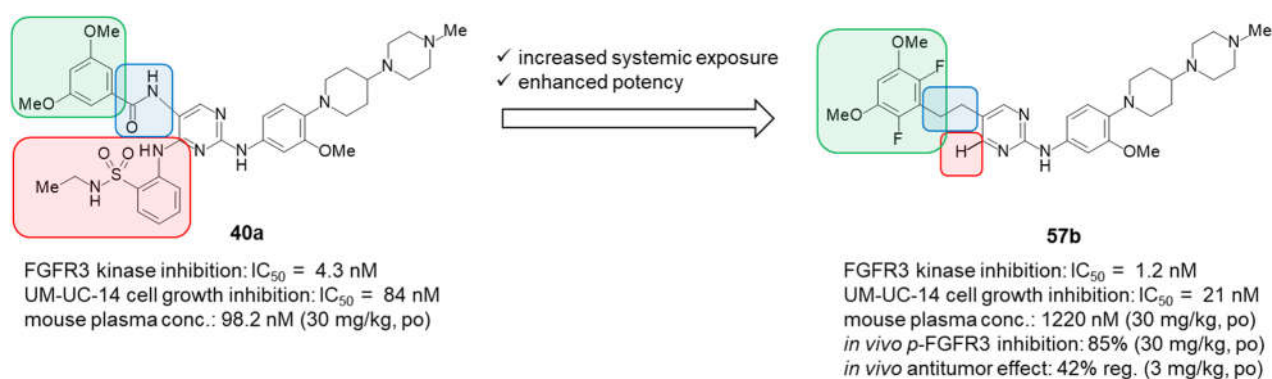


Figure 14. Summary of Chapter 2.

第三章 ADMET の課題を克服した開発候補化合物 ASP5878 の創出

第一節 リード化合物取得とその課題

前章の背景

第二章では、リード化合物 **57b**(Figure 15)が *in vitro* にて強力な汎 FGFR 酵素阻害活性、及び FGFR3 酵素 S249C 変異蛋白を強制発現させた NIH/3T3 細胞に対する強力な細胞増殖阻害活性を有することを述べた(Table 9)。加えて *in vivo*にて強力な FGFR3 自己リン酸化阻害活性、及び膀胱がん異種移植ヌードマウスへの経口投与による腫瘍退縮効果が認められた(Table 10)。

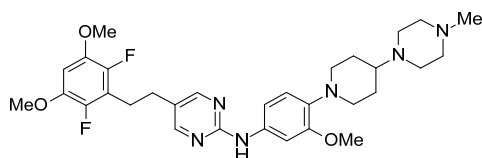


Figure 15. Structure of compound **57b**.

リード化合物**57b**の課題

化合物 **57b** の各種プロファイリグを進めた結果、代謝安定性の指標であるヒト肝マイクロソームにおける *in vitro* 固有クリアランス値が肝血流量よりも高く($hCL_{int} = 171 \text{ mL/min/kg}$)、また強力な human ether- α -go-go related gene (*hERG*)チャネル阻害活性($IC_{50} = 10 \mu\text{M}$)を有していた。*hERG* チャネルは心臓における急速活性型の遅延整流カリウム電流の調整を担っており、不整脈や突然死の重篤なリスクを伴う QT 間隔延長などの心毒性に関連している⁶¹⁾。これらの懸念を克服するために、さらなるピリミジン誘導体の最適化に着手した。開発化合物を選択するに際し、*in vitro* *hERG* 電流アッセイ、及び *in vivo* イヌテレメトリーテストの両試験を通じて、心毒性の懸念が無い化合物の創出に挑戦した。

化合物 57b の課題解決に向けた化合物デザイン

化合物 57b のヒトにおける代謝安定性を向上させるために、市販ソフトウェアの ADMET predictor⁶²⁾ を用いて化合物構造内の代謝部位を予想し、その代謝部位に構造修飾を施す計画を立てた。予測計算結果からは、溶媒領域を占有している *N*-メチル-ピペラジニル-ピペリジンユニット(青色ハイライト)とメトキシフェニルユニット(赤色ハイライト)、及びバックポケット周辺を占有している 2,6-ジフルオロ-3,5-ジメトキシフェニルユニット(図示なし)とエチレンリンカーユニット(緑色ハイライト)が代謝部位の候補となった (Figure 16)。それらの内 2,6-ジフルオロ-3,5-ジメトキシフェニルユニットは、これまでの構造最適化の過程で FGFR3 酵素との結合、及び VEGFR2 酵素との選択性に重要であるため、この部分の構造変換は回避した。(1)青色箇所では複数の代謝部位が予測されたことから、アミン類を抜本的に変えつつ化合物の物理化学的性質が類似した種々の環状ジアミン及びトリアミン構造を導入すること、(2)赤色箇所ではメトキシ基の脱メチル化を受けない構造として、フェニルエーテル構造を回避した類縁置換基、及び代謝位置を嵩高としたエトキシ基を導入すること、(3)緑色箇所ではエチレン部分のヒドロキシル化を回避するために、第二章 Table 6 の知見を活かしてベンジルエーテルリンカーに変換することを計画した (Figure 17a)。続いて *h*ERG チャンネル阻害活性を抑制するための戦略として、塩基性三級窒素が置換されたベンゼン環構造が *h*ERG チャンネル阻害剤の典型的な部分構造として知られているため⁶³⁾、フェニル基を避けて電子不足の 5 員環、及び 6 員環の複素芳香族環を有する化合物を設計した (Figure 17b)。

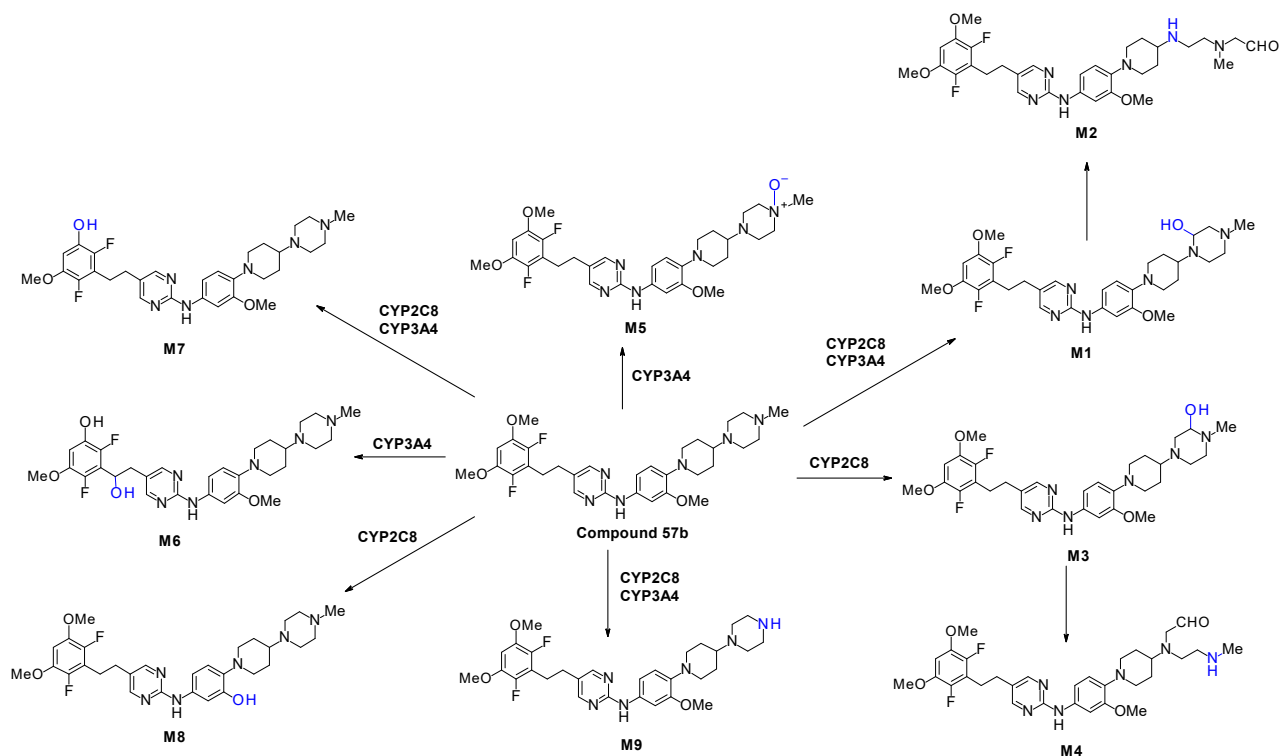
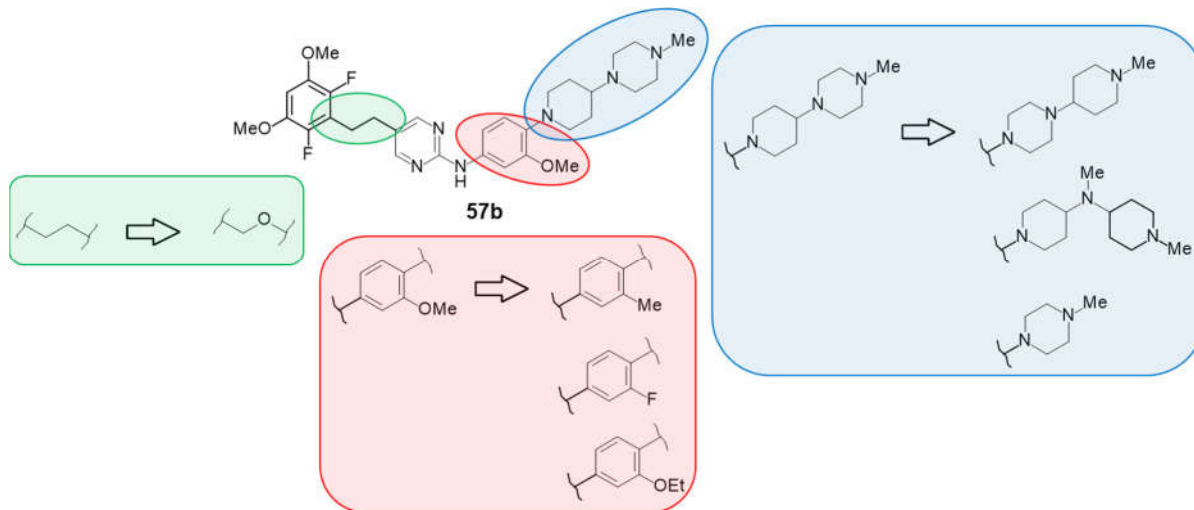


Figure 16. Predicted metabolic positions of **57b** calculated by ADMET predictor⁶².

(a)



(b)

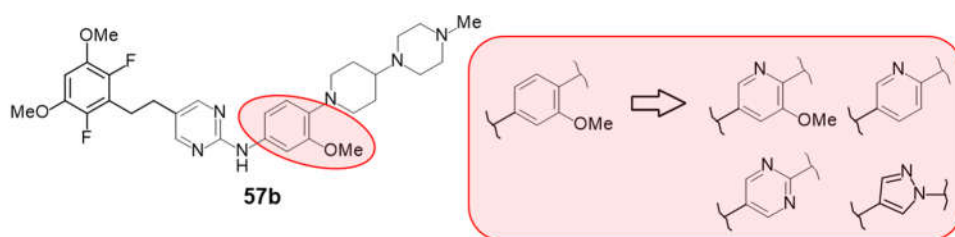
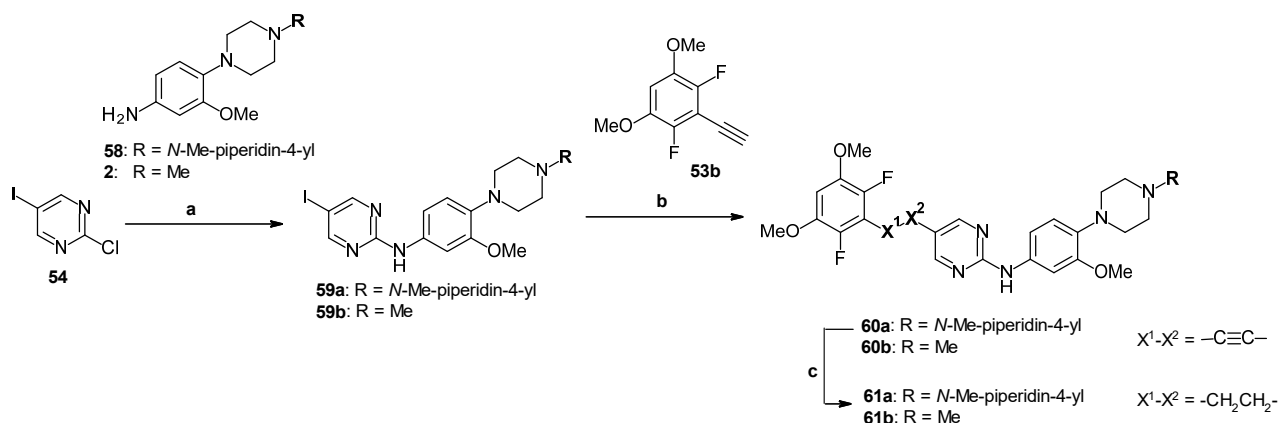


Figure 17. Strategy of structural transformation (a) to improve metabolic stability (b) to suppress *h*ERG channel inhibitory activity.

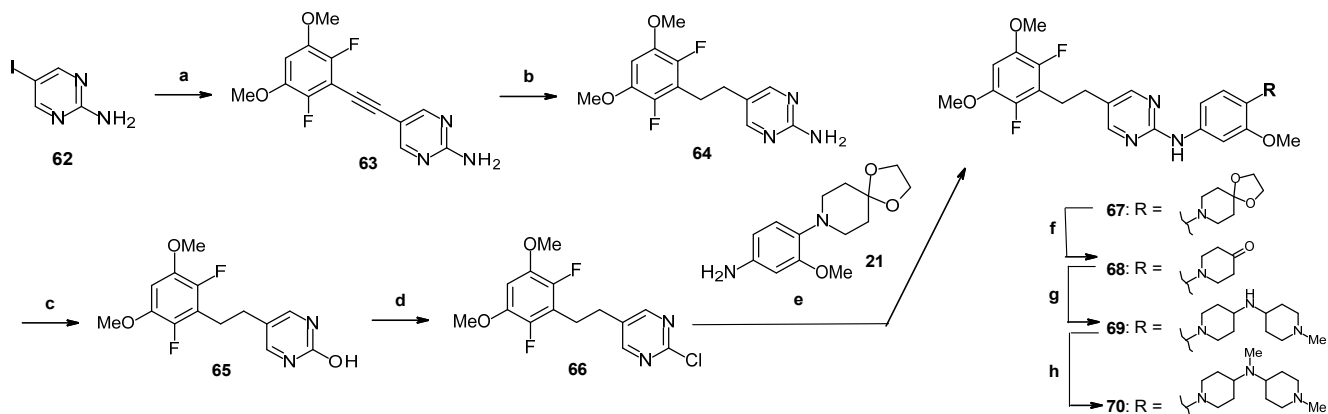
第二節 ピリミジン誘導体の合成

デザインしたピリミジン誘導体の合成方法を、以下の Scheme 11-14 に示す。まず、化合物 61a と 61b の合成方法を Scheme 11 に示す。化合物 58⁴⁵⁾、2 と市販化合物 54 との酸性条件下での S_NAr 反応により、化合物 59a、59b を取得後、これらを化合物 53b との菌頭カップリング反応に付して化合物 60a、60b を得た。続いて、アルキン部位を *in-situ* で生成させたジイミドで処理して水素化し、目的化合物 61a、61b へと導いた。



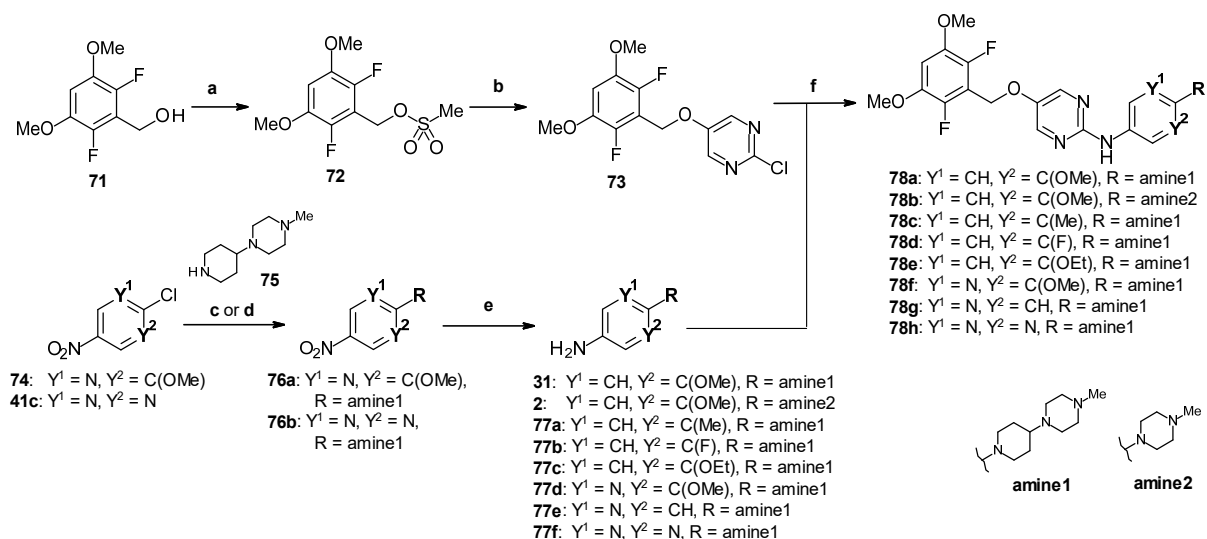
Scheme 11. Reagents and conditions: (a) 58 or 2, MsOH, IPA, microwave (μ W), 130 °C, 56–66%; (b) 53b, Pd(PPh₃)₄, CuI, DIPEA, DMF, 80 °C, 45–72%; (c) *p*-toluenesulfonyl hydrazide, NaOAc, DME/H₂O, 110 °C, 69–77%.

化合物 70 は、Scheme 12 のルートに従って合成した。市販化合物 62 を化合物 53b との菌頭カップリング反応に付して化合物 63 を取得後、アルキンリンカー部分の水素ガスとの接触水素化により化合物 64 を得た。化合物 64 の Sandmeyer 反応によるジアゾ化を経て、続く加水分解反応により化合物 65 へと変換した。さらにオキシ塩化リンを用いたクロロ化により化合物 66 へと導いた後、化合物 21 との Buchwald カップリング反応条件に付して化合物 67 を得た。続いて、アセタール部位を加水分解して化合物 68 を取得した。目的の化合物 70 へは、化合物 69 を途中経由させた 2 段階の還元的アミノ化反応により達成した。



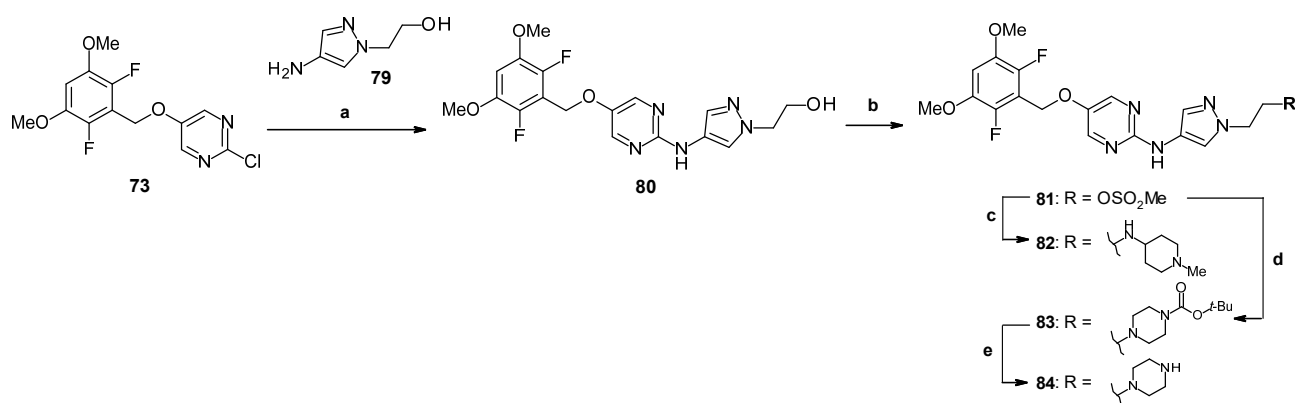
Scheme 12. Reagents and conditions: (a) **53b**, Pd(PPh₃)₄, CuI, DIPEA, DMF, 80 °C, 49%; (b) H₂ (1.2 atm), Pd/C, MeOH/THF, 60 °C, 99%; (c) NaNO₂, AcOH/H₂O, 70 °C, quant.; (d) POCl₃, *N,N*-dimethylaniline, 100 °C, 74%; (e) **21**, Pd(OAc)₂, *rac*-BINAP, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane, 100 °C, 67%; (f) conc. HCl *aq.*, AcOH/H₂O, 80 °C, quant.; (g) 1-methylpiperidin-4-amine, NaBH(OAc)₃, DCE, room temperature, 23%; (h) 1*H*-benzotriazole-1-methanol, NaBH(OAc)₃, CH₂Cl₂/MeOH, room temperature, 87%.

続いて、**Scheme 13** には化合物 **78a-h** の合成方法を示す。市販化合物 **71** のヒドロキシル基をメシル化して化合物 **72** へと変換し、続いて 2-クロロピリミジン-5-オールと反応させて化合物 **73** へと導いた。一方で、市販化合物 **74**、**41c** と化合物 **75** との S_NAr 反応により化合物 **76a**、**76b** を取得後、ニトロ基を水素化して化合物 **77d**、**77f** へと変換した。最後に合成中間体 **2**、**77d**、**77f**、市販化合物 **31**、及び既知化合物 **77a**⁴⁵⁾、**77b**⁶⁴⁾、**77c**⁴⁵⁾、**77e**⁴⁵⁾ と化合物 **73** との Buchwald カップリング反応条件に付して、目的化合物 **78a-h** を得た。



Scheme 13. Reagents and conditions: (a) methanesulfonyl chloride, Et₃N, THF, 0 °C, 100%; (b) 2-chloropyrimidin-5-ol, K₂CO₃, DMF, 60 °C, 96%; (c) **75**, DIPEA, 1,4-dioxane, 80 °C, 75% for **76a**; (d) **75**, K₂CO₃, DMF, room temperature, 35% for **76b**; (e) H₂ (1.0 atm), Pd/C, EtOH, room temperature, 94–100%; (f) Pd(OAc)₂, *rac*-BINAP, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane, 100 °C, 7–76%.

最後に、化合物 **80**、**82**、**84** の合成方法を **Scheme 14** に示す。化合物 **73** と市販化合物 **79** との Buchwald カップリング反応により化合物 **80** を得た。続いて、ヒドロキシ基をメシル化して化合物 **81** へと変換後、さらに対応するアミン類を導入して化合物 **82**、**83** を取得した。化合物 **83** は、TFA により Boc 基を除去して化合物 **84** へと導いた。



Scheme 14. Reagents and conditions: (a) **79**, Pd(OAc)₂, *rac*-BINAP, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane, 100 °C, 55%; (b) methanesulfonyl chloride, Et₃N, THF, 0 °C, 76%; (c) 1-methylpiperidin-4-amine, NMP, 80 °C, 21%; (d) 1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperazine, NMP, 80 to 120 °C, 53%; (e) TFA, room temperature, 65%.

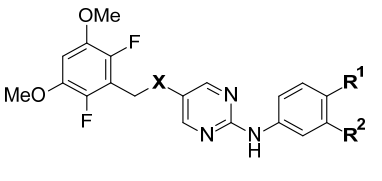
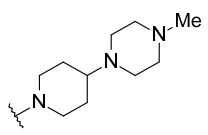
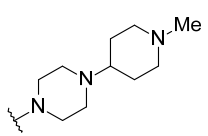
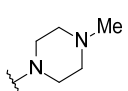
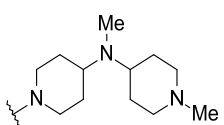
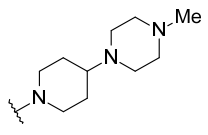
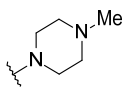
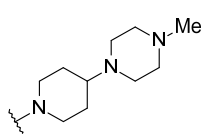
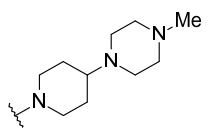
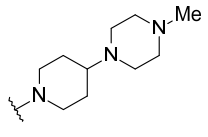
第三節 合成した化合物のスクリーニング結果とその考察

合成した化合物は、ヒト組み換え FGFR3 酵素を用いた ADP-Glo luminescent kinase assay、FGFR3 酵素 S249C 変異蛋白を強制発現させた NIH/3T3 細胞を用いた細胞増殖アッセイ、さらには代謝安定性と膜透過性を評価した。選択された化合物は、それらに加えて hERG チャンネル阻害活性、マウス血漿中濃度、及び FGFR3 酵素の自己リン酸化阻害に対する *in vivo* 薬理活性を評価した。

ヒト代謝安定性獲得を目指した構造最適化

Table 11 は、ヒト代謝安定性を向上させることを目的とした置換基 R¹、R²、及びリンカーX の SAR を示している。置換アミノ構造 R¹ が化合物 57b と異なる化合物 61a、61b、70 は、化合物 57b と比較して同等の FGFR3 酵素阻害活性、及び細胞活性を示した。代謝安定性に関しては化合物 61b では改善が認められなかった一方で、化合物 61a と 70 は各々の Log D_{7.4} 値が低いことが要因となったためか、化合物 57b よりも hCL_{int} 値が 3 倍以上低い結果を与えた。続いてリンカーX の変換については、2,6-ジフルオロ-3,5-ジメトキシベンゼン環とピリミジン環をエーテルリンカーで連結させた化合物 78a と 78b が、化合物 57b や 61b と同程度の酵素阻害活性、及び細胞活性を示した。さらに化合物 78a と 78b のヒト代謝安定性は、化合物 57b や 61b と比較して約 3~4 倍改善した。最後に置換基 R² を変換した結果、化合物 78c(メチル基)と 78d(フルオロ基)は化合物 78a と同程度の薬理活性、及びヒト代謝安定性を示した一方で、化合物 78e(エトキシ基)の場合は Log D_{7.4} 値が化合物 78a よりも高いにもかかわらず、高い薬理活性を維持しつつ化合物 78a の hCL_{int} 値よりも低い結果を与えた。

Table 11. Results of optimizing substituents R¹, R² and linker X.

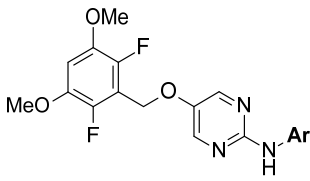
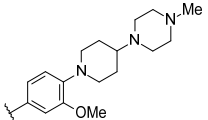
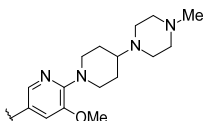
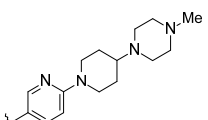
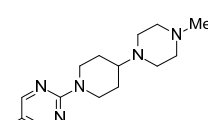
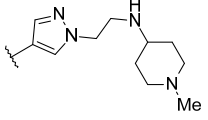
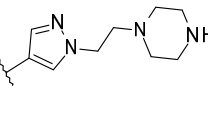
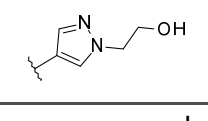
No				Enzyme FGFR3 IC ₅₀ (nM)	Cellular FGFR3 IC ₅₀ (nM) ^a	<i>h</i> CL _{int} (mL/min/kg) _b	Log <i>D</i> _{7.4}	PAMPA (10 ⁻⁶ cm/sec) _c
	X	R ¹	R ²					
57b	CH ₂		OMe	1.2	13	171	3.0	18.4
61a	CH ₂		OMe	1.4	33	51	2.5	3.5
61b	CH ₂		OMe	1.5	18	101	3.0	>30.0
70^d	CH ₂		OMe	1.1	24	48	2.5	<0.9
78a	O		OMe	1.1	13	40	3.3	11.2
78b	O		OMe	1.6	NT ^e	39	3.0	16.2
78c	O		Me	1.7	20	58	4.1	20.6
78d	O		F	<1.0	5.5	42	3.6	26.6
78e	O		OEt	1.1	NT ^e	<23	3.8	16.8

^a NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C.

- ^b *In vitro* intrinsic clearance using human liver microsomes.
- ^c Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) at pH = 6.5.
- ^d Tetra-hydrochloride salt.
- ^e Not tested.

Table 12 では、置換アリール基 Ar の SAR を示す。ベンゼン環に変えてピリジン環を導入した化合物 **78f** と **78g** は、いずれも化合物 **78a** と同程度の強力な酵素阻害活性と細胞活性を示した。ピリミジン環を持つ化合物 **78h** の酵素活性は化合物 **78a** よりもわずかに低下したが、その細胞活性は化合物 **78a** と同程度であった。続いてピラゾール環を有する化合物 **82**、**84**、**80** は、化合物 **78a** に匹敵する両薬理活性を示した。一方で代謝安定性に関しては、この表中のいずれの化合物においても化合物 **78a** より低い hCL_{int} 値を示しており、各々の $\text{Log } D_{7.4}$ 値が低いことが要因だと考察した。

Table 12. Results of optimizing substituent Ar.

No		Enzyme FGFR3 IC ₅₀ (nM)	Cellular FGFR3 IC ₅₀ (nM) ^a	<i>h</i> CL _{int} (mL/min/kg) ^b	Log <i>D</i> _{7.4}	PAMPA (10 ⁻⁶ cm/sec) ^c
78a		1.1	13	40	3.3	11.2
78f		1.3	3.8	26	2.8	14.4
78g		2.0	17	34	2.7	15.1
78h		4.5	29	39	2.7	18.4
82 ^d		2.7	32	<23	0.7	<1.4
84 ^d		1.2	13	<23	0.2	<1.1
80		2.1	11	<23	2.3	13.3

^a NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C.

^b *In vitro* intrinsic clearance using human liver microsomes.

^c Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) at pH = 6.5.

^d Tri-hydrochloride salt.

hERG チャンネル阻害活性の評価結果

Table 13 には、QPatch システムを用いた hERG チャンネル阻害活性の結果を示す。化合物間の比較のために、表中の IC₅₀ 値に加えて各評価濃度における電流抑制率をプロットした Concentration-Response Curves(CRC)も Figure 18 に示す。化合物 61a、78d、78f は、化合物 57b よりも hERG チャンネル阻害活性が増強した。続いて化合物 70、78a、78b、78e の IC₅₀ 値は算出できなかったが、CRC から鑑みて化合物 57b よりも低濃度側に左方シフトしており、hERG チャンネル阻害活性が増強したと解釈できた。一方で複素芳香族環が導入された化合物群においては、化合物 78g と 78h の IC₅₀ 値は化合物 57b と同程度であったが、化合物 82 と 84 は hERG チャンネル阻害活性が化合物 57b の 8 倍以上低減した。さらに化合物 80 の IC₅₀ 値が算出できなかったものの、10 μM 以下の濃度で化合物 82 や 84 と同様の CRC を示した。この結果から鑑みて化合物 80 では、化合物 82 や 84 と同じく hERG チャンネル阻害活性の低減傾向が認められた。

幾つかの hERG チャンネル阻害剤は、その構造中に塩基性三級アミノ基とフェニル基の両方を含む傾向があり、hERG チャンネルの Tyr652 と π -カチオン相互作用を介して、若しくは Phe656 と π - π スタッキング相互作用を介して相互作用する⁶⁵⁾。したがって三級アミノ基の塩基性や芳香族環の π 電子密度が、hERG チャンネルに対する親和性に影響を与える可能性がある。両相互作用に関わる化合物の指標として、塩基性については分子内の最も高い塩基性部位の pKa 値である Most Basic pKa 計算値を、また π 電子密度については溶媒領域を占める芳香族環周辺環境における最高被占分子軌道エネルギー(E_{HOMO})計算値を各々算出した(E_{HOMO} は芳香環に直結した原子までの部分構造を用い、Schrödinger 社の Maestro を使って最安定構造を発生させ、その配座での電子密度を計算した⁶⁶⁾)。その結果、化合物 57b、61a、70、78a、78b では pKa 値と hERG チャンネル阻害活性とは相関しないことが示された。一方で E_{HOMO} 値が低い化合物 82、84、80 は、化合物 78a よりも大きく低減した hERG チャンネル阻害活性を示した。さらに化合物 78g と 78h の場合は、基準となる化合物 78a に比べて緩やかな hERG チャンネル阻害活性の低減効果が示された。これらの E_{HOMO} 値との相関が認められた結果から鑑みて、著者は溶媒領域を占める芳香族環の π 電子供与能が低下して hERG チャンネルの Phe656 との π - π スタッキング相互作用が弱まったことが、hERG チャンネル阻害活性の低下を引き起こしていると推察した。

Table 13. *h*ERG channel inhibitory activity using the Qpatch system.

No.	<i>h</i> ERG channel inhibitory activity ^a IC ₅₀ (μM)	Calculated most basic pKa ^b	Calculated E _{HOMO} (eV) ^c
57b	10	8.14	-0.147
61a	4.5	9.28	-0.147
70^d	>1.0	10.10	-0.147
78a	>3.0	8.14	-0.147
78b	>3.0	7.75	-0.147
78d	7.6	8.14	-0.159
78e	>3.0	8.14	-0.147
78f	8.1	11.42 (8.14) ^e	-0.158
78g	14	8.14	-0.164
78h	14	8.14	-0.178
82^f	83	9.22	-0.175
84^f	89	9.15	-0.175
80	>10	3.43	-0.175

^a Human ether-á-go-go related gene (*h*ERG) channel inhibitory activity using the Qpatch system.

^b Most basic pKa values were calculated using Advanced Chemistry Development (ACD)/Percepta software (version 2018.2.5).

^c Highest occupied molecular orbital energy (E_{HOMO}) values were calculated by the software Jaguar in Schrödinger (Maestro version 12.7.156) using density-functional theory calculation with B3LYP/6-31G(d,p).⁶⁶⁾ The calculations were conducted using the substructures which contained the focused aromatic moieties with only one atom adjacent to the rings.

^d Tetra-hydrochloride salt.

^e Most basic pKa value except for the nitrogen atom in the pyridine moiety.

^f Tri-hydrochloride salt.

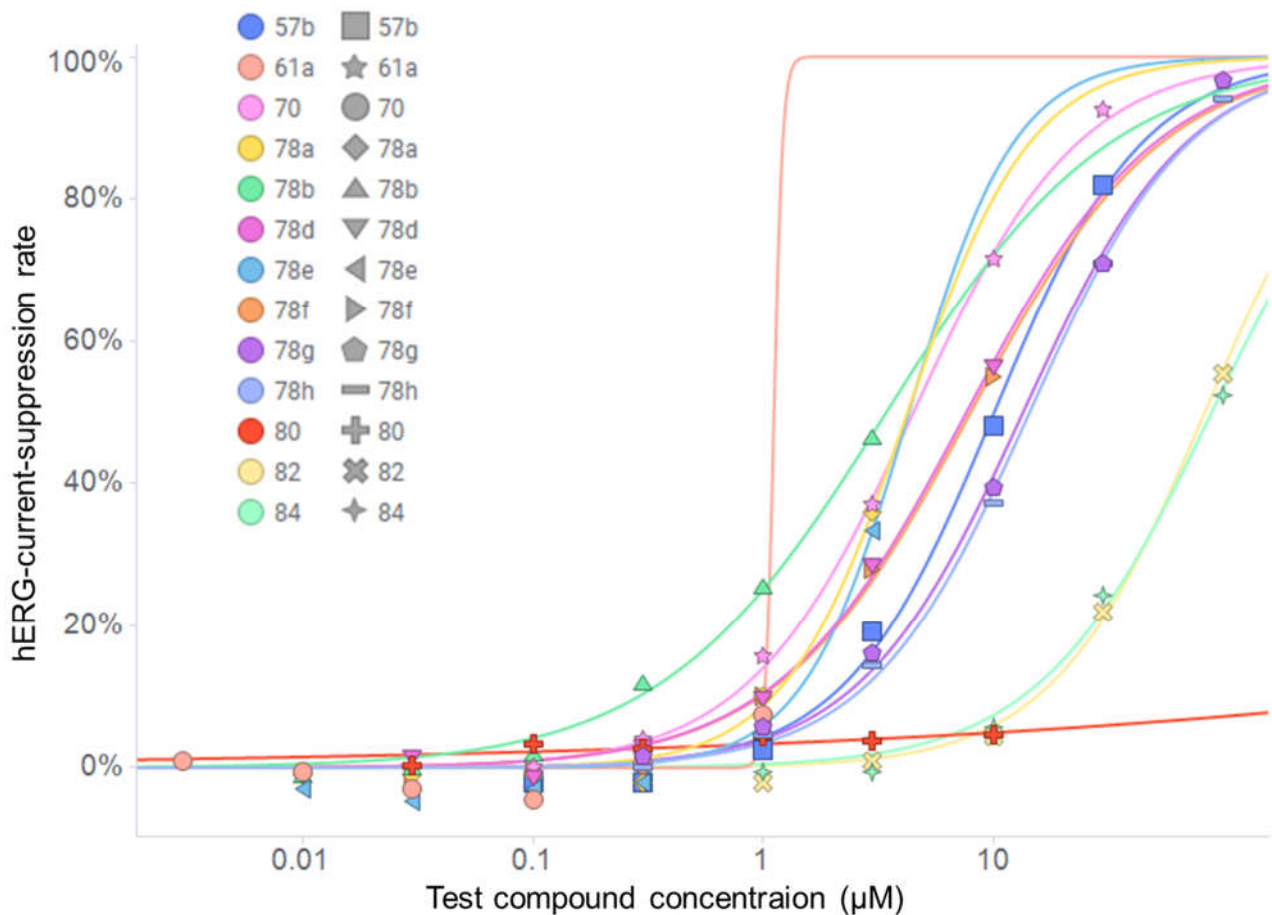


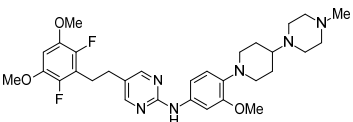
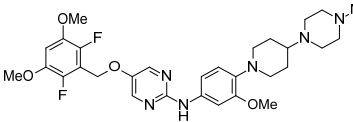
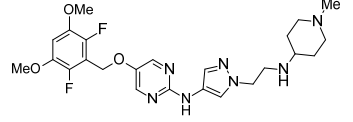
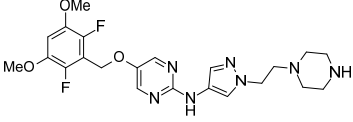
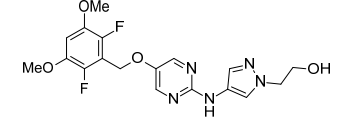
Figure 18. Concentration-response curves of current-suppression rates against hERG channel.

マウスを用いた *in vivo* での薬理評価

Table 14 には、被験物質を 30 mg/kg 経口投与した時の血漿中濃度、及びその時の FGFR3 自己リン酸化阻害活性を示している。血漿中濃度は ICR マウスへ化合物を投与して 6 時間後に採血し、LC-MS/MS を用いて測定した。腫瘍中での FGFR3 自己リン酸化阻害活性は、FGFR3 酵素 S249C 変異蛋白を強制発現させた NIH/3T3 細胞を異種移植したヌードマウスを用いて評価した。化合物を投与して 6 時間後に腫瘍を採材し、サンドイッチ ELISA 法により測定した。化合物 **78a** は化合物 **57b** よりも全身曝露が改善されていたが、腫瘍への化合物移行性の違いのためか、*in vivo* での薬理活性は化合物 **57b** よりも低かった。一方で化合物 **82** と **84** は膜透過性が低く、全身曝露が化合物 **57b** よりも極めて低かった。これらと対照的に、化合物 **80** は同じピラゾール環を有する化合物群にもかかわらず、その膜透過性が

改善していることに起因してマウス全身暴露が上昇し、化合物 **57b** に匹敵する *in vivo* 薬理活性を示した。

Table 14. Plasma concentration and *in vivo* inhibitory activity against FGFR3 phosphorylation.

No	Structure	Plasma concentration (nM) ^a	p-FGFR3 (% inh.) ^b
57b		1220	85
78a		2790	67
82^c		50.2	NT ^d
84^c		305	NT ^d
80		1570	82

^a Plasma concentrations were measured using LC-MS/MS at 6 h after a single oral administration of test compounds at 30 mg/kg to ICR mice (average of 3 mice).

^b *In vivo* inhibition rate of FGFR3 phosphorylation in nude mice xenografted with NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C at 6 h after a single oral administration of test compounds at 30 mg/kg (average of 3 mice).

^c Tri-hydrochloride salt.

^d Not tested.

第四節 開発候補化合物 80 の高次評価

第三節にて示した通り、化合物 80 は高いマウス血漿中濃度、*in vivo* での強力な FGFR3 阻害活性、改善されたヒト代謝安定性、抑制された *h*ERG チャンネル阻害活性等の優れた特徴を有していることから、本化合物を開発化合物の候補として選定し、追加の高次評価(薬理活性、安全性、薬物動態)を実行した。

薬理活性評価

化合物 80 の種々のチロシンキナーゼ類に対する薬理作用の選択性を確認した。まず FGFR 類については FGFR3 以外の FGFR サブタイプに対しても、FGFR3 の IC₅₀ 値と同程度の強力な酵素阻害活性を示した(FGFR1、2、3、4 の IC₅₀ 値はそれぞれ 0.47、0.60、0.74、3.5 nM)。また、他の代表的なチロシンキナーゼ類に対して優れた選択性を示した(128 種類のヒト酵素のうち、FGFR 類、VEGFR2、FMS に対してのみ、化合物濃度 200 nM で 50%以上の酵素活性が阻害された)。さらに化合物 80 は、ヒト膀胱がん細胞 UM-UC-14 に対して IC₅₀ = 7.8 nM の強力な細胞増殖阻害活性を示し、それ加えて UM-UC-14 細胞株皮下異種移植マウスモデルにおいて 1 mg/kg 以上の経口投与にて腫瘍退縮作用を示した⁶⁷⁾。

安全性評価

*h*ERG 電流に対して詳細に影響を調査する目的で、*h*ERG チャンネルを遺伝子導入した HEK293 細胞を用いた全細胞パッチクランプ法を試験した。化合物 80 を 1、3、10 μM の濃度で 13 分間作用させたところ、平均となる抑制率はそれぞれ 7.0%、9.1%、9.1%であった。対照群の抑制率と比較した結果、これらの試験濃度では化合物投与群における統計的に有意な差は認められなかった。本結果から、化合物 80 は *h*ERG を遺伝子導入した HEK293 細胞において、*in vitro* パッチクランプ試験法で 10 μM の被験物質濃度までは *h*ERG 電流に影響を与えないことが示された。

次に、中枢神経系、心血管系、及び呼吸器系に対する化合物 80 の影響を調べる目的で、無麻酔条件下で 11 カ月齢と 12 カ月齢の雄のビーグル犬に対して、化合物 80 を経口にて単回投与した(Table 15)。一

般状態に加えて、行動、体温、血圧、心拍数、心電図、呼吸数、血液ガス、及び血液電解質濃度への影響を調査した。被験物質が全身曝露されているかの確認のために化合物 **80** の血漿中濃度を測定しており、化合物の投与量に応じて C_{max} 、及び AUC_{24} の増大が認められた。1 mg/kg の投与量では、一般状態、行動、体温、血圧、心拍数、心電図、呼吸数、血液ガス、血液電解質濃度のいずれにも影響を与えなかった。10 mg/kg の投与量では、1 匹のみに嘔吐症状が認められた。100 mg/kg の投与量では、3 匹に嘔吐、2 匹に薬物混入便、また投与 8 時間後に血圧上昇、投与 24 時間後に心拍数低下が認められた。これらの所見は、いずれも休薬後の回復が認められた。したがって、化合物 **80** を 1、10、及び 100 mg/kg で単回経口投与しても、イヌの中樞神経系、心血管系、及び呼吸器系に対する重篤な副作用は認められなかった。

Table 15. Safety study on central nervous, cardiovascular, and respiratory system in dogs.^{a, b}

Dose (mg/kg) ^c	0 ^d	1	10	100
t_{max} (h) ^e	NC	1.3	3.0	4.5
C_{max} (ng/mL) ^f	NC	769	3540	9020
AUC_{24} (ng·h/mL) ^g	NC	571	39600	111000
Clinical Signs [No. of animals]				
Vomiting	---	---	P [1]: 5 h 14 min	P [3]: 4 h 55 min-19 h 55 min
Compound-colored feces	---	---	---	P [2]: 24 h
Blood Pressure at 8 h ^h				
Systolic (mmHg)	142	145	151	158‡
Diastolic (mmHg)	84	86	94	101‡
Mean (mmHg)	103	106	113	121‡
Heart Rate (beats/min) at 24 h ^h	86	79	82	58**†

^a Each value is an average of data from four male beagle dogs.

^b Compound **80** did not affect body temperature, blood pressure, heart rate, electrocardiogram, respiration rate, blood gases, and blood electrolyte concentrations.

^c The same animals were dosed repeatedly under a crossover dose design.

^d 0.5 w/v% Methylcellulose aqueous solution.

^e Time to reach C_{max} .

^f Maximum plasma concentration.

^g Area under the plasma concentration-time curve from 0 to 24 h.

^h The data represent only those obtained at time points with high values (for blood pressure) or statistical significant difference (for heart rate) compared to control group.

NC: Not calculated.

P: Present.

---: No noteworthy findings.

**₁: P<0.01 (Statistically significant level).

†: Dunnett test.

‡: An increase in blood pressure was noted.

薬物動態評価

絶食条件下の雄性 SD ラット、または雄性ビーグル犬に対し、化合物 **80** を静脈内、及び経口投与した (Table 16)。その結果、化合物 **80** は両動物における肝血流量⁶⁸⁾以下となる魅力的な全身クリアランス値(CL_{tot})で、且つ極めて高い経口バイオアベイラビリティ(F)を示した。

Table 16. Pharmacokinetic profiles of **80** in rats and dogs.^a

Spec ies	Dose (mg/kg) ^b	iv				po			
		CL_{tot} ^c (L/h/kg)	V_{ss} ^d (L/kg)	$T_{1/2}$ ^e (h)	AUC_{inf} ^f (ng·h/ mL)	C_{max} ^g (ng/ mL)	T_{max} ^h (h)	AUC_{inf} ^f (ng·h/ mL)	F_i (%)
Rat ^j	0.3	0.349	0.671	1.7	864	196	1.0	657	76.1
Dog ^k	0.1	0.080	0.665	9.6	1258	119	1.0	1181	94.2

^a Each value is an average of data from four animals (n = 3 in the case of iv administration in rats).

^b Dosing solvent: water for injection containing 1% DMF, 50% PEG400, and HCl solution of 1.5 equivalent mol to **80**.

^c Total body clearance.

^d Volume of distribution at steady state.

^e Elimination half-life from plasma.

^f Area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity.

^g Maximum plasma concentration.

^h Time to reach maximum plasma concentration.

ⁱ Absolute oral bioavailability.

^j Sprague-Dawley (male, fasted).

^k Beagle (male, fasted).

次に、化合物 **80** の中枢移行性を確認する目的で、放射性標識化された化合物 **80** (Figure 19) を Scheme 15 に沿って準備した。化合物 **80** のピリミジン環内の1つの炭素原子が、安定同位体である ¹²C から放射性同位体である ¹⁴C へと変わっている。放射性標識化合物 **80** を 1 mg/kg の用量でラットに単回経口投与した後、1、4、24、48、及び 72 時間における血漿中、及び脳内放射能濃度を測定した (Table 17)。放射性標識化合物 **80** の脳内分布は 1、4、及び 24 時間にて観測され、その $K_{p,brain}$ 値は各々0.15、0.20、及び0.69であった。放射性標識化合物 **80** は血液脳関門を通過してラットの脳に流入できたことから、化合物 **80** は中枢移行性を有することが明らかになった。

Table 17. Time course of plasma and brain concentrations and $K_{p,brain}$ of [¹⁴C]-labeled **80** in rats.

	1h	4h	24h	48h	72h
Plasma (ng equivalents/mL) ^a	856.77 ± 42.39	202.62 ± 14.64	3.10 ± 0.90	ND ^b	ND ^b
Brain (ng equivalents/g) ^a	131.30 ± 19.79	40.33 ± 3.48	2.10 ± 0.32	ND ^b	ND ^b
$K_{p,brain}$	0.15 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.69 ± 0.09	NC ^c	NC ^c

^a Radioactivity concentrations (Mean ± SD) after a single oral administration of [¹⁴C]-labeled **80** to male SD rats at a dose of 1 mg/kg (n = 3)

^b Not detected.

^c Not calculated.

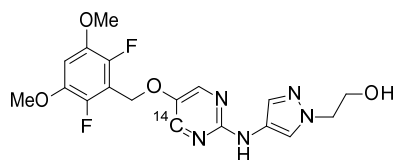
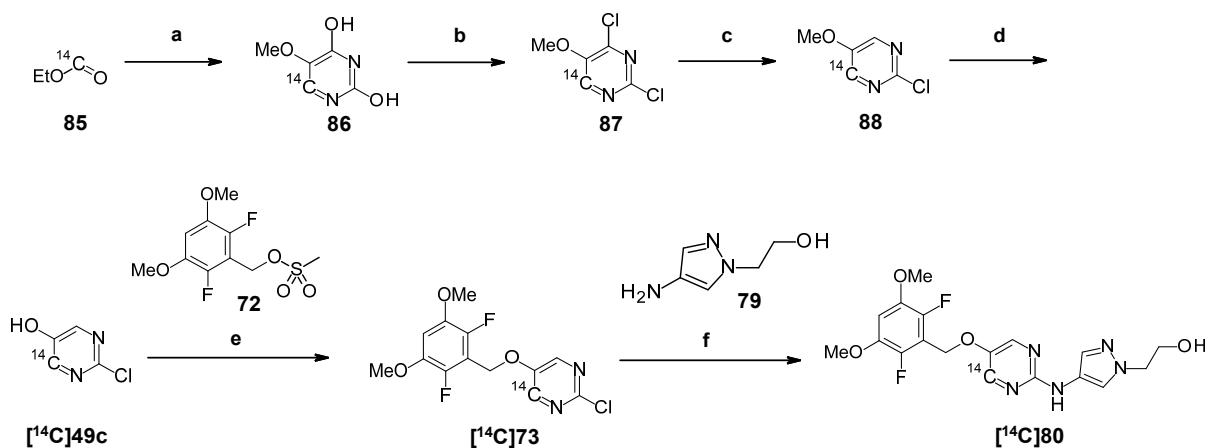


Figure 19. Chemical structure of compound [¹⁴C]-labeled **80**.



Scheme 15. Reagents and conditions: (a) (i) $\text{MeOCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$, NaH , toluene, room temperature (ii) urea, EtOH , 90°C ; (b) POCl_3 , PhNMe_2 , 130°C ; (c) Zn dust, $\text{EtOH}/\text{H}_2\text{O}$, 80°C ; (d) BBr_3 , CH_2Cl_2 , room temperature; (e) **72**, Cs_2CO_3 , DMF , room temperature; (f) **79**, $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, *rac*- BINAP , K_2CO_3 , 1,4-dioxane, 90°C .

これら高次評価における薬理活性、薬物動態、及び安全性プロファイルを総合的に判断して、化合物 **80** を臨床試験に進める化合物として選択し、**ASP5878** と命名した。**ASP5878 (80)** は FGFR3 依存性の膀胱がん患者の治療に魅力的な薬剤候補であり、膀胱がんからの脳転移を持つ患者に対しての追加効果も期待される。有望な前臨床プロファイルを持つ **ASP5878 (80)** は、2013 年に尿路上皮がん、肝細胞がん、扁平上皮肺がん患者を対象としたフェーズ I 臨床試験に進んだ(NCT02038673)⁶⁹⁾。

第五節 本章のまとめ

第二章で見出したリード化合物 **57b** が *in vivo* にて強力な薬理作用を示した一方で、低いヒト代謝安定性や高い *h*ERG チャンネル阻害活性の観点での懸念を有しており、これらの課題を克服する目的でピリミジン誘導体の構造最適化に着手した。化合物デザインにおいては、まずヒト代謝安定性を向上させる目的で代謝部位予測ソフトウェアにより構造変換部位を絞り込んだ。予測結果から、溶媒領域を占めるアミノユニット部位とメトキシ基部位、及びバックポケット周辺に位置するエチレンリンカー部位を構造変換する候補として選出した。次に *h*ERG チャンネル阻害活性低減については、標的認識部位として有力な溶媒領域を占めるフェニル基部分に焦点を当てて化合物を設計した。

最初にヒト代謝安定性を向上させることを目的とした検討では、アミノユニット部位の変換では脂溶性の低減に伴うヒト代謝安定性改善効果に留まった。一方でメトキシ基部位とエチレンリンカー部位の構造変換では、化合物 **78a** と **78e** において薬理活性が同程度に維持した上で、脂溶性低減を伴うことなくヒト代謝安定性を改善させることに成功した。続いて *h*ERG チャンネル阻害活性を抑制することを狙った構造変換では、フェニル基部分をピラゾール環へと変換した化合物 **82**、**84**、**80** において、基準となる化合物 **78a** と比較して高い薬理活性とヒト代謝安定性を維持しつつ、*h*ERG チャンネル阻害活性について 8 倍以上の低減効果を達成した。

*h*ERG チャンネル阻害活性の低減効果についての考察として、医薬品と *h*ERG チャンネルとの代表的な相互作用である Tyr652 との π -カチオン相互作用、及び Phe656 との π - π スタッキング相互作用に着目した。両相互作用との関連が予想される分子全体の Most Basic pKa 計算値、及び芳香族環周辺環境における最高被占分子軌道エネルギー (E_{HOMO}) の計算値を算出した。その結果、本誘導体においては pKa 値と *h*ERG チャンネル阻害活性とは相関しておらず、 E_{HOMO} 値との相関が認められた。著者はこの結果から、*h*ERG チャンネルにおける Phe656 との π - π スタッキング相互作用の減弱が、*h*ERG チャンネル阻害活性の低下を引き起こしていると推察した。

最適化研究の過程で得られた有望化合物群に対して、マウスへの経口投与時の血漿中濃度、及び *in vivo* 薬理作用を確認したところ、膜透過性が低い化合物 **82** と **84** では血漿中濃度が極めて低い結果だった。一方で膜透過性が維持した化合物 **80** においてのみ血漿中濃度が維持でき、化合物 **57b** に匹敵する *in*

vivo 薬理活性を示した。

魅力的なプロファイルを有する化合物 **80** の高次評価の結果、安全性に関しては(1)*in vitro* 全細胞パッチクランプ法での *h*ERG 電流への影響が 10 μ M までは影響を与えないこと、(2)イヌに単回経口投与した際には、100 mg/kg までは中枢神経系、心血管系、及び呼吸器系に対する重篤な副作用は認められないことを確認した。薬物動態に関しては(1)ラット及びイヌにおいて肝血流以下の全身クリアランス値と高い経口バイオアベイラビリティを示したこと、(2)放射性標識化合物 **80** をラットに経口投与すると投与後 1、4、及び 24 時間にて脳内からの放射線量が観測され、中枢移行性を有することが明らかとなった。これら高次評価における薬理活性、薬物動態、及び安全性プロファイルを総合的に判断して、化合物 **80** を臨床試験に進める化合物として選択し、**ASP5878** と命名した。**ASP5878(80)** は FGFR3 依存性の膀胱がん患者の治療に魅力的な薬剤候補であり、膀胱がんからの脳転移を持つ患者に対する追加効果も期待される。有望な前臨床プロファイルを持つ **ASP5878(80)** は、2013 年に尿路上皮がん、肝細胞がん、扁平上皮肺がん患者を対象としたフェーズ I 臨床試験に進んだ(NCT02038673)。

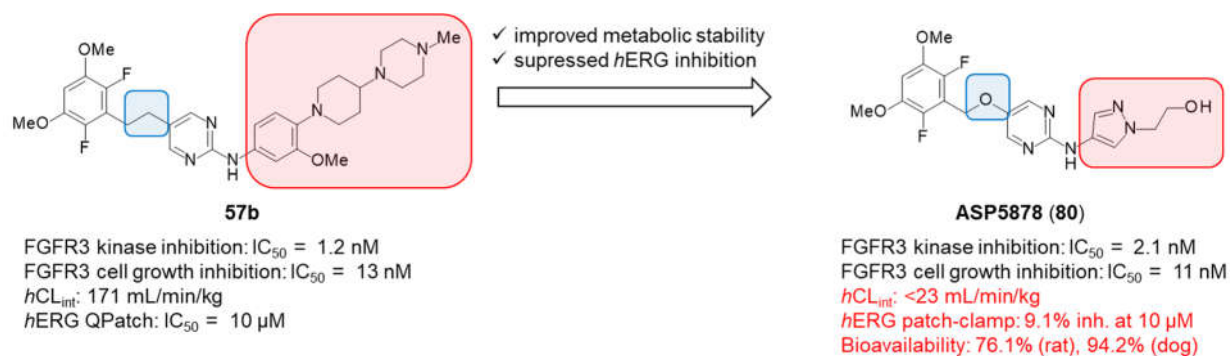


Figure 20. Summary of Chapter 3.

結論

著者は、がん治療を目的とした高活性かつ選択的な線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)阻害剤の創製を目指し、標的蛋白と化合物との複合体構造情報に基づく SBDD アプローチによる理論的な化合物デザインを経て、ピリミジン誘導体の構造活性相関研究を行った。その結果、以下の知見を得た。

第一章では、アステラス所有の大規模化合物ライブラリを用いて FGFR3 酵素阻害活性評価によるハイスループットスクリーニングを実行し、ヒット化合物 **1** を取得した。化合物 **1** は FGFR1、2、3 に対する酵素阻害活性が強力であったが、VEGFR2 酵素阻害活性との選択性に乏しかった。化合物 **1** と FGFR2 酵素との X 線複合体構造解析を活用した SBDD アプローチにより、理論的に VEGFR2 との酵素選択性を拡大させる2つの戦略を立案した。第一に溶媒領域周辺に配置されている Lys476 側鎖との水素結合を、第二にバックポケット周辺に配置されている Met529 側鎖との疎水性相互作用を各々形成する計画を立てた。

前者のアプローチでは、化合物 **1** のベンゼン環上 3'位メトキシ基の先に水素結合受容基を導入し、FGFR3 酵素阻害活性が3倍増強し VEGFR2 との選択性は 139 倍に広がった化合物 **18b** を見出した。化合物 **18b** と FGFR2 蛋白との複合体構造の解析結果によると、期待通り Lys485 のアミノ側鎖にあるアミノ基と弱い水素結合(3.1Å)を形成したことに加え、予想に反して化合物 **18b** のモルホリン内のメチレン部位が Met497 のアミノ酸側鎖と疎水的相互作用を形成したことが、VEGFR2 に対して高い選択性で FGFR3 酵素阻害活性を示した 1 つの要因であると著者は考察した。

後者のアプローチでは、化合物 **1** の 1,3,5-トリアジン環の 1 位から伸長させてバックポケットへアクセスし、FGFR3 酵素阻害活性が3倍増強し VEGFR2 との選択性は 233 倍以上に広がった化合物 **40a** を見出した。化合物 **40a** の類縁構造である化合物 **37** と FGFR3 蛋白との X 線複合体構造解析から、計画当初に予想した通り 3,5-ジメトキシフェニル基部分はバックポケットを占有し、Met529 のアミノ酸側鎖である S δ 原子、C ϵ 原子と vdW 相互作用を形成していた。対照的に、この置換基は VEGFR2 蛋白の Leu889 のアミノ酸側鎖である C δ 原子のみと vdW 相互作用を形成していることが、VEGFR2 酵素に対する選択性が獲得できた 1 つの要因と考察した。

化合物 **40a** は、高い FGFR 選択的阻害活性を有する一方で、薬物動態の観点から *in vivo* での薬理活性評価が困難であったため、化合物 **40a** を起点とした最適化研究を継続した。

第二章では、得られた化合物 **40a** の物理化学的性質や代謝安定性を改善するために、ピリミジン誘導体の構造最適化に着手した。化合物 **37** と FGFR3 の X 線複合体結晶構造に基づき、Lipinski's rule of five のルールを参考に分子量がより低く、水素結合受容基がより少ない化合物をデザインした。シュガーポケットを占有している *N*-エチル-2-スルファモイル-アニリノ基を水素原子へと置き換えた化合物 **48** は、10 倍前後の FGFR3 酵素阻害、及び細胞増殖阻害活性の僅かな減弱を認めただ一方で、PAMPA や JP2 溶解性が共に改善された。化合物 **48** と FGFR3 酵素との複合体の X 線結晶構造の解析結果では、エチレンリンカー部位が周辺の疎水性アミノ酸側鎖群との複合的な相互作用を形成しており、リンカー部位の SAR 結果と矛盾が無いことを確認した。さらに化合物 **48** の 3,5-ジメトキシフェニル基部位に2つのフルオロ基を導入した化合物 **57b** において、顕著な酵素阻害活性、及び細胞活性の増強が認められ、且つ良好な膜透過性と JP2 溶解性を示した。化合物 **57b** に導入されたフルオロ基の効果を明らかにする目的で分子動力学シミュレーションに着手したところ、フルオロ基の近傍にある4つのアミノ酸残基の内、Asp635 の主鎖 NH 部位に対しては水素置換やクロロ基の場合よりもフルオロ基にて Asp635 との距離がより短い傾向を示した。フッ素原子が持つ高い電気陰性度が影響して Asp635 の主鎖 NH 部分との水素結合が形成できたことが、酵素阻害活性向上の1つの理由であると予想した。

最適化研究の成果として得られた化合物 **57b** は、*in vivo* にてマウスでの高い血漿中濃度や、その時の腫瘍細胞内での高い FGFR3 自己リン酸化阻害活性を示した。さらには、UM-UC-14 膀胱がん細胞株を異種移植したヌードマウスモデルを用いた *in vivo* 抗腫瘍試験にて腫瘍サイズの退縮効果が認められたことから、膀胱がん患者の治療に向けた有望なリード化合物であると結論付けた。

一方でリード化合物 **57b** は、ヒトにおける薬物動態、及び安全性の観点での懸念点を有しており、臨床試験に進める候補化合物の創出に向けてリード化合物 **57b** を起点とした最適化研究を継続した。

第三章では、得られたリード化合物 **57b** の低いヒト代謝安定性や高い *h*ERG チャンネル阻害活性の2つの課題を克服する目的で、ピリミジン誘導体の構造最適化に着手した。ヒト代謝安定性を向上させる目的で、

代謝部位予測ソフトウェアを活用して構造変換サイトを絞り込んだ。その結果、メトキシ基部位とエチレンリンカー部位をそれぞれ変換した化合物 **78a** と **78e** において、薬理活性が同程度に維持した上で脂溶性低減を伴うことなくヒト代謝安定性を改善させることに成功した。

*h*ERG チャンネル阻害活性低減については、標的認識部位として有力な溶媒領域を占めるフェニル基部分に焦点を当てて化合物を設計した。その結果、ピラゾール環へと変換した化合物 **82**、**84**、**80** において高い薬理活性とヒト代謝安定性を維持しつつ、*h*ERG チャンネル阻害活性について 8 倍以上の低減効果を達成した。考察のために、*h*ERG チャンネルとの相互作用への影響が予想される化合物パラメーターを算出したところ、Most basic pKa 値とは相関しておらず、一方で E_{HOMO} 値との相関が認められた。著者はこの結果から、*h*ERG チャンネルにおける Phe656 との π - π スタッキング相互作用の減弱が、*h*ERG チャンネル阻害活性の低下を引き起こしていると推察した。

最適化研究の過程で得られた有望化合物群の内、高い膜透過性を維持できた化合物 **80** においてのみ、マウスへの経口投与時の高い血漿中濃度、及び強力な *in vivo* 薬理活性が認められた。魅力的なプロファイルを有する化合物 **80** の高次評価の結果、安全性に関しては(1)*in vitro* 全細胞パッチクランプ法での *h*ERG 電流への影響が 10 μM までは影響を与えないこと、(2)イヌに単回経口投与した際には、100 mg/kg までは中枢神経系、心血管系、及び呼吸器系に対しての重篤な副作用は認められないことを確認した。薬物動態に関しては(1)ラット及びイヌにおいて、肝血流以下の全身クリアランス値と高い経口バイオアベイラビリティを示したこと、(2)放射性標識化合物 **80** をラットに経口投与した結果、中枢移行性を有することが明らかになった。

本研究により、FGFR3 酵素阻害活性を有するピリミジン誘導体の構造活性相関研究に関する多様な知見を得た。その結末として、高い薬理活性、及び優れた薬物動態と安全性プロファイルを有する化合物 **80** の創出に成功した。本化合物を臨床試験に進める化合物として選択し、**ASP5878** と命名した。**ASP5878(80)**は、FGFR3 依存性の膀胱がん患者の治療に向けた魅力的な薬剤候補であり、膀胱がんからの脳転移を持つ患者に対しての追加効果も期待される。有望な前臨床プロファイルを持つ **ASP5878(80)**は、2013 年に尿路上皮がん、肝細胞がん、扁平上皮肺がん患者を対象としたフェーズ I 臨床試験に進んだ(NCT02038673)。

これらの研究成果が、今後の FGFR 酵素阻害剤の研究・開発に応用されることを期待する。

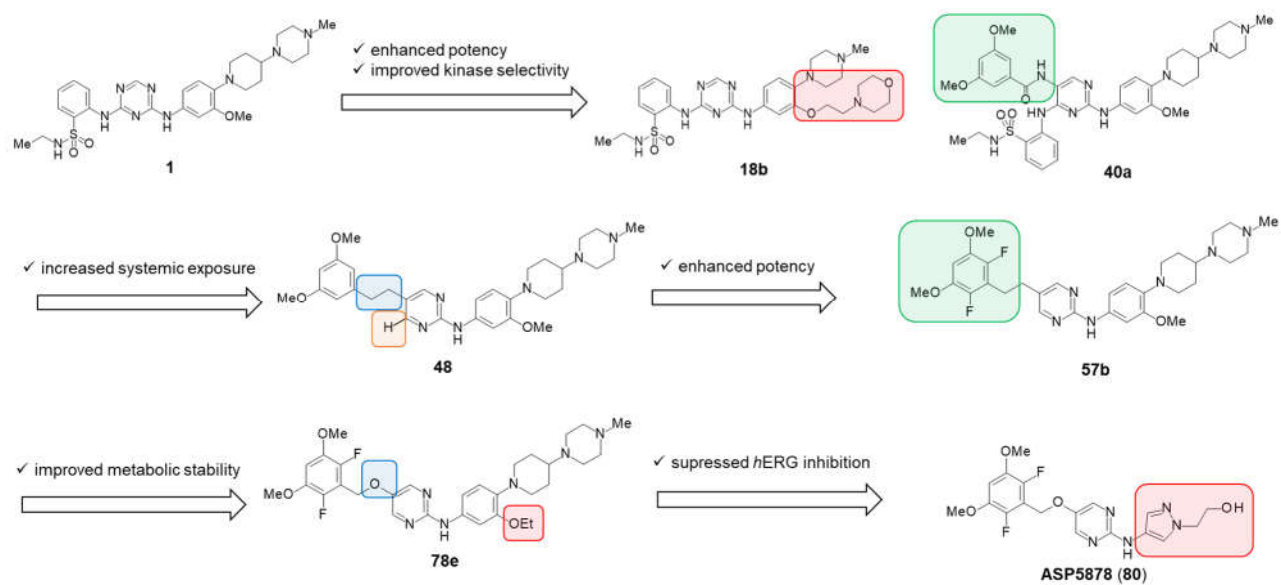


Figure 21. Summary of all chapters.

実験の部

Chemistry

¹H-NMR spectra were recorded on Burker Advance III HD, Varian 400, Varian VNS-400, Varian 400-MR, JEOL Lambda, or JEOL EX-400. ¹³C-NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III-HD500 spectrometer. Chemical shifts are expressed in δ (ppm) values with tetramethylsilane as an internal reference (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, dd = doublet of doublets, qd = quartet of doublets, and br = broad peak). Mass spectra (MS) were recorded on Thermo Electron LCQ Advantage, Thermo Electron TSQ 700, Thermo Trace DSQ, Waters ZQ, Waters ZQ2000, Waters SQD, or Agilent Quadrupole. Electrospray ionization (ESI) positive high resolution mass spectra (HRMS) were obtained using Thermo Fisher EXACTIVE-Plus. Elemental analyses were performed with Yanaco MT-6 (C, H, N), Elementar Vario MICRO cube (C, H, N), Elementar Vario EL (C, H, N), Elementar Vario EL III (C, H, N), DIONEX DX-500 (S, halogen), DIONEX ICS-2000 (S, halogen), DIONEX ICS-3000 (S, halogen), or DIONEX ICS-5000 (S, halogen) instruments, and the results were within $\pm 0.4\%$ of theoretical values. Melting point was determined on a BÜCHI M-565 melting point apparatus and are uncorrected.

Chapter 1

N-Ethyl-2-({4-[3-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzene-1-sulfonamide (4)

To a solution of 3-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)aniline (**2**, 120 mg, 0.542 mmol) in EtOH (3.0 mL) was added methanesulfonic acid (70.0 μ L, 1.08 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 min, and 2-[(4-chloro-1,3,5-triazin-2-yl)amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (**3**⁴²), 204 mg, 0.650 mmol) was added. After stirring at 80 °C for 2 h, the mixture was neutralized with sat. NaHCO₃ *aq.* and then extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 100:10:1) to give the product (102 mg, 38%) as a beige solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.04 (3H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.37 (3H, s), 2.54–2.73 (4H, m), 2.99 (2H, q, *J* = 7.3 Hz), 3.03–3.17 (4H, m), 3.84 (3H, br s), 4.79–4.99 (1H, m), 6.85–6.93 (1H, m), 6.93–7.01 (1H, m), 7.15–7.23 (1H, m), 7.28–7.43 (1H, m), 7.49–7.63 (1H, m), 7.93 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 8.37 (1H, br s), 8.45 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.74–9.07 (1H, m); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 499; *Anal.* Calcd for C₂₃H₃₀N₈O₃S·0.3CHCl₃·0.6H₂O: C, 51.33; H, 5.82; N, 20.55; S, 5.88; Cl, 5.85. Found: C, 51.37; H, 5.73; N, 20.51; S, 5.82; Cl, 5.62.

Ethyl [5-amino-2-(4-methylpiperazin-1-yl)phenoxy]acetate (6)

To a solution of ethyl [2-(4-methylpiperazin-1-yl)-5-nitrophenoxy]acetate (**5**⁴³), 275 mg, 0.850 mmol) in MeOH (3.0 mL) was added 5% Pd/C (50% wet, 30.0 mg) under an argon atmosphere. After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 7 h, the mixture was passed through a Celite pad and washed with MeOH. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 25:1 to 10:1) to give the product (180 mg, 72%) as a brown oil. ¹H NMR (CD₃OD): δ 1.29 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.66 (3H, s), 2.92–3.30 (8H, m), 4.24 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.68 (2H, s), 6.32–6.34 (2H, m), 6.80 (1H, d, *J* = 9.2 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 294.

Ethyl [5-({4-[2-(ethylsulfamoyl)anilino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)-2-(4-methylpiperazin-1-yl)phenoxy]acetate (7)

To a solution of **6** (180 mg, 0.614 mmol) in EtOH (4.0 mL) was added methanesulfonic acid (66.2 μL, 1.02 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 20 min, and **3**⁴²) (160 mg, 0.510 mmol) was added. After stirring at 100 °C for 3 h, the mixture was neutralized with sat. NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 50:1 to 20:1) to give the product (141 mg, 49%) as a yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.05 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.28 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.37 (3H, s), 2.50–2.75 (4H, m), 2.98 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 3.01–3.28 (4H, m), 4.26 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 4.66 (2H, br s), 5.54 (1H, br s), 6.88–6.95 (2H, m), 7.17–7.21 (1H, m), 7.26–7.72 (3H, m), 7.94 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz), 8.33 (1H, br s), 8.42 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.92 (1H, br s); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₆H₃₅N₈O₅S [M+H]⁺: 571.2446. Found: 571.2444.

[5-({4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)-2-(4-methylpiperazin-1-yl)phenoxy]acetic acid (8)

To a solution of **7** (116 mg, 0.203 mmol) in EtOH (1.0 mL) was added 10% NaOH *aq.* (300 μL). After stirring at 80 °C for 1 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with H₂O, and 10% HCl *aq.* was added to the mixture. The resulting precipitate was filtered and dried to give the product (46.0 mg, 42%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (CD₃OD): δ 1.00 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.89–3.33 (9H, m), 3.51–3.76 (4H, m), 4.60 (2H, br s), 6.97 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.17–7.25 (2H, m), 7.35–7.45 (1H, m), 7.51–7.63 (1H, m), 7.90 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz), 8.33–8.54 (2H, m); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₄H₃₁N₈O₅S [M+H]⁺: 543.2133. Found: 543.2138.

***tert*-Butyl 4-[2-(2-methoxyethoxy)-4-nitrophenyl]piperazine-1-carboxylate (10a)**

To a solution of 1-chloro-2-(2-methoxyethoxy)-4-nitrobenzene (**9a**, 4.23 g, 18.3 mmol) in DMF (40 mL) were added 1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperazine (3.40 g, 18.3 mmol) and K₂CO₃ (5.05 g, 36.5 mmol). After stirring at 80 °C for 48 h, the mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H₂O followed by brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 9:1 to 5:1) to give the product (1.56 g, 22%) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.49 (9H, s), 3.15–3.25 (4H, m), 3.45 (3H, s), 3.54–3.64 (4H, m), 3.79–3.81 (2H, m), 4.21–4.23 (2H, m), 6.85 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.71 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.86 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.8 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 382.

***tert*-Butyl 4-{2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]-4-nitrophenyl}piperazine-1-carboxylate (10b)**

Compound **10b** was prepared from 1-chloro-2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]-4-nitrobenzene (**9b**) in 15% yield using a similar approach to that described for **10a**. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.49 (9H, s), 3.14–3.28 (4H, m), 3.38 (3H, s), 3.55–3.61 (6H, m), 3.69–3.71 (2H, m), 3.89–3.91 (2H, m), 4.23–4.26 (2H, m), 6.85 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.71 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 7.85 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 426.

***tert*-Butyl 4-[4-amino-2-(2-methoxyethoxy)phenyl]piperazine-1-carboxylate (11a)**

Compound **11a** was prepared from **10a** in 98% yield using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.48 (9H, s), 3.41 (3H, s), 3.53–3.76 (6H, m), 3.94–4.10 (4H, m), 4.14–4.17 (2H, m), 6.28–6.31 (2H, m), 7.94–8.11 (1H, m); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 352.

***tert*-Butyl 4-{4-amino-2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]phenyl}piperazine-1-carboxylate (11b)**

Compound **11b** was prepared from **10b** in 74% yield using a similar approach to that described for **6**. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.48 (9H, s), 3.36 (3H, s), 3.36–3.80 (8H, m), 3.84–3.86 (2H, m), 3.98–4.15 (4H, m), 4.18–4.21 (2H, m), 6.32–6.34 (2H, m), 7.98–8.21 (1H, m); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 396.

***tert*-Butyl 4-[4-({4-[2-(ethylsulfamoyl)anilino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)-2-(2-methoxyethoxy)phenyl]piperazine-1-carboxylate (12a)**

To a solution of **11a** (187 mg, 0.532 mmol) and **3⁴²** (200 mg, 0.637 mmol) in NMP (2.0 mL) was added DIPEA (180 μL, 1.06 mmol). After stirring at 120 °C under

microwave irradiation for 20 min, the mixture was diluted with H₂O. The resulting precipitate was filtered and dried. The obtained solid was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 2:1 to 1:2) to give the product (120 mg, 36%) as a brown solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.04 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.49 (9H, s), 2.89–3.08 (6H, m), 3.44 (3H, s), 3.52–3.66 (4H, m), 3.72–3.82 (2H, m), 4.02–4.26 (2H, m), 5.26 (1H, br s), 6.82 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.83–7.03 (1H, m), 7.17–7.21 (1H, m), 7.26–7.74 (3H, m), 7.93 (1H, dd, *J* = 7.6, 2.0 Hz), 8.33 (1H, br s), 8.43 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.93 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 629.

***tert*-Butyl 4-({4-({4-[2-(ethylsulfamoyl)anilino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)-2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]phenyl}piperazine-1-carboxylate (12b)**

Compound **12b** was prepared from **11b** and **3**⁴²⁾ in 44% yield using a similar approach to that described for **12a**. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.04 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 1.49 (9H, s), 2.92–3.07 (6H, m), 3.37 (3H, s), 3.51–3.63 (6H, m), 3.69–3.71 (2H, m), 3.83–3.92 (2H, m), 4.07–4.23 (2H, m), 4.97 (1H, br s), 6.83–7.03 (2H, m), 7.17–7.21 (1H, m), 7.49–7.62 (1H, m), 7.93 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz), 8.38 (1H, br s), 8.45 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.93 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 673.

***N*-Ethyl-2-({4-[3-(2-methoxyethoxy)-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]-1,3,5-triazin-2-yl}amino)benzene-1-sulfonamide (13a)**

To a solution of **12a** (120 mg, 0.191 mmol) in CH₂Cl₂ (2.0 mL) was added TFA (1.0 mL). After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with sat. NaHCO₃ *aq*, and extracted with CHCl₃/MeOH. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/40% CH₃NH₂ MeOH sol. = 100:0 to 60:1) to give the product (80.0 mg, 79%) as a gray solid. To a solution of the obtained intermediate (65.0 mg, 0.123 mmol) in CH₂Cl₂ (1.5 mL) was added 37% HCHO *aq*. (91.6 μL, 1.23 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 1 h, and NaBH(OAc)₃ (51.0 mg, 0.241 mmol) was added. After stirring at room temperature for 6 h, the mixture was neutralized with sat. NaHCO₃ *aq*. and extracted with CH₂Cl₂. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 40:1 to 15:1) to give the product (35.0 mg, 53%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.03 (3H, t, *J* = 7.6 Hz), 2.37 (3H, s), 2.52–2.74 (4H, m), 2.97 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 3.00–3.22 (4H, m), 3.44 (3H, s), 3.72–3.83 (2H, m), 4.02–4.20 (2H, m), 5.36 (1H, br s), 6.85–7.01 (2H, m), 7.16–7.20 (1H, m), 7.20–7.78 (3H, m), 7.93 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz), 8.33 (1H, br s), 8.44 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.93 (1H, br s); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₅H₃₅N₈O₄S [M+H]⁺: 543.2496. Found: 543.2484.

***N*-Ethyl-2-[(4-{3-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino}-1,3,5-triazin-2-yl)amino]benzene-1-sulfonamide (13b)**

Compound **13b** was prepared from **12b** in 2 steps in 55% yield using a similar approach to that described for **13a**.

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.03 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.37 (3H, s), 2.52–2.72 (4H, m), 2.97 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 3.00–3.23 (4H, m), 3.36 (3H, s), 3.54–3.56 (2H, m), 3.69–3.72 (2H, m), 3.83–3.92 (2H, m), 4.04–4.21 (2H, m), 5.30 (1H, br s), 6.85–7.02 (2H, m), 7.16–7.20 (1H, m), 7.26–7.70 (3H, m), 7.93 (1H, dd, *J* = 7.6, 2.0 Hz), 8.35 (1H, br s), 8.43 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.93 (1H, br s); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₇H₃₉N₈O₅S [M+H]⁺: 587.2759. Found: 587.2754.

4-[3-(2-Chloro-5-nitrophenoxy)propyl]morpholine (15a)

To a solution of 2-(3-bromopropoxy)-1-chloro-4-nitrobenzene (**14**, 1.00 g, 3.40 mmol) in MeCN (20 mL) were added morpholine (355 μL, 4.07 mmol), K₂CO₃ (562 mg, 4.07 mmol) and KI (113 mg, 0.679 mmol). After stirring at 60 °C for 15 h, the mixture was diluted with H₂O and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 95:5) to give the product (646 mg, 63%) as a yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.03–2.11 (2H, m), 2.43–2.52 (4H, m), 2.57 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 3.66–3.79 (4H, m), 4.21 (2H, t, *J* = 6.3 Hz), 7.39–7.63 (1H, m), 7.75–7.83 (2H, m); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 301.

4-{3-[2-(4-Methylpiperazin-1-yl)-5-nitrophenoxy]propyl}morpholine (16a)

To a solution of **15a** (400 mg, 1.33 mmol) in DMSO (3.3 mL) were added *N*-methylpiperazine (293 μL, 2.66 mmol) and K₂CO₃ (368 mg, 2.66 mmol). After stirring at 150 °C overnight, the mixture was diluted with H₂O and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with CHCl₃. The organic layer was washed with H₂O and concentrated *in vacuo* to give the product (200 mg, 41%). MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 365.

4-{2-[2-(4-Methylpiperazin-1-yl)-5-nitrophenoxy]ethyl}morpholine (16b)

To a solution of 4-[2-(2-chloro-5-nitrophenoxy)ethyl]morpholine (**15b**, 731 mg, 2.42 mmol) in NMP (10 mL) were added *N*-methylpiperazine (798 μL, 7.25 mmol) and K₂CO₃ (1.00 g, 7.25 mmol). After stirring at 150 °C for 6 h, the mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (*n*-hexane/CHCl₃ = 70:30 to 0:100) to give the product (465 mg, 55%) as a yellow oil. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.35 (3H, s), 2.45–2.68 (8H, m), 2.80–2.90 (2H, m), 3.24–3.51 (4H, m), 3.53–3.81 (4H,

m), 4.10–4.32 (2H, m), 6.88 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.71 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.86 (1H, dd, $J = 8.8, 2.5$ Hz); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 351.

5.1.16. 1-Methyl-4-{2-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]-4-nitrophenyl}piperazine (16c)

Compound **16c** was prepared from 1-[2-(2-chloro-5-nitrophenoxy)ethyl]-4-methylpiperazine (**15c**) in 43% yield using a similar approach to that described for **16b**. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 2.30 (3H, s), 2.36 (3H, s), 2.39–2.72 (12H, m), 2.86 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 3.22–3.36 (4H, m), 4.19 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.70 (1H, d, $J = 2.5$ Hz), 7.85 (1H, dd, $J = 8.9, 2.5$ Hz); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 364.

4-(4-Methylpiperazin-1-yl)-3-[3-(morpholin-4-yl)propoxy]aniline (17a)

To a solution of **16a** (200 mg, 0.549 mmol) in EtOH (3.1 mL)/H₂O (0.77 mL) were added FeCl₃ hexahydrate (44.5 mg, 0.165 mmol), activated carbon (46.1 mg) and hydrazine monohydrate (266 μL , 5.49 mmol). After stirring at 100 °C for 18 h, the mixture was passed through a Celite pad and washed with EtOAc. The filtrate was dried over Na₂SO₄ and concentrated to give the product (170 mg, 93%) as a yellow solid. MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 335.

4-(4-Methylpiperazin-1-yl)-3-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]aniline (17b)

Compound **17b** was prepared from **16b** in 100% yield using a similar approach to that described for **17a**. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 2.35 (3H s), 2.44–2.70 (8H m), 2.77–2.88 (4H, m), 2.95–3.11 (4H, m), 3.66–3.77 (4H, m), 4.03–4.11 (2H, m), 6.18–6.32 (2H, m), 6.75–6.79 (1H, m); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 321.

4-(4-Methylpiperazin-1-yl)-3-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]aniline (17c)

Compound **17c** was prepared from **16c** in 100% yield using a similar approach to that described for **17a** with the reaction temperature changed to 80 °C. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3): δ 2.32–2.39 (3H, m), 2.47 (3H, s), 2.52–2.88 (14H, m), 3.03–3.19 (4H, m), 3.39–3.58 (2H, m), 4.04–4.11 (2H, m), 6.16–6.32 (2H, m), 6.74–6.80 (1H, m); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 334.

N-Ethyl-2-[(4-{4-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-[3-(morpholin-4-yl)propoxy]anilino}-1,3,5-triazin-2-yl)amino]benzene-1-sulfonamide (18a)

A mixture of **17a** (170 mg, 0.508 mmol) and AcOH (8.9 mL) was stirred at room temperature for 30 min before **3**⁴²) (159 mg, 0.508 mmol) was added. After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with sat. NaHCO₃ aq., and the mixture was extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl₃/MeOH

= 100:0 to 90:10) to give the product (87 mg, 28%). ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.87–1.03 (3H, m), 1.77–1.96 (2H, m), 2.22 (3H, s), 2.28–2.50 (10H, m), 2.71–2.87 (2H, m), 2.87–3.03 (4H, m), 3.47–3.63 (4H, m), 3.77–4.10 (2H, m), 6.72–6.85 (1H, m), 6.95–7.15 (1H, m), 7.20–7.31 (1H, m), 7.34–7.51 (1H, m), 7.52–7.69 (1H, m), 7.81 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz), 7.87–8.05 (1H, m), 8.32–8.54 (2H, m), 9.02–9.28 (1H, m), 9.70–9.91 (1H, m); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 612; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₉H₄₂N₉O₄S [M+H]⁺: 612.3075. Found: 612.3076.

***N*-Ethyl-2-[(4-{4-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-[2-(morpholin-4-yl)ethoxy]anilino}-1,3,5-triazin-2-yl)amino]benzene-1-sulfonamid (18b)**

Compound **18b** was prepared from **17b** and **3**⁴²⁾ in 15% yield using a similar approach to that described for **18a**. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.95 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.21 (3H, s), 2.36–2.53 (8H, m), 2.62–2.74 (2H, m), 2.83 (2H, q, *J* = 7.2 Hz), 2.90–3.03 (4H, m), 3.49–3.60 (4H, m), 3.88–4.06 (2H, m), 6.80 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.94–7.13 (1H, m), 7.19–7.29 (1H, m), 7.29–7.49 (1H, m), 7.50–7.69 (1H, m), 7.81 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz), 7.84–8.06 (1H, m), 8.28–8.70 (2H, m), 9.17 (1H, br s), 9.82 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 598; *Anal.* Calcd for C₂₈H₃₉N₉O₄S.0.2IPE.1.2H₂O: C, 54.82; H, 6.96; N, 19.70; S, 5.01. Found: C, 54.78; H, 6.83; N, 19.73; S, 5.06.

***N*-Ethyl-2-[(4-{4-(4-methylpiperazin-1-yl)-3-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)ethoxy]anilino}-1,3,5-triazin-2-yl)amino]benzene-1-sulfonamide tetrahydrochloride (18c)**

The free form of **18c** was prepared from **17c** (157 mg, 0.471 mmol) and **3**⁴²⁾ (148 mg, 0.471 mmol) using a similar approach to that described for **18a**. To the free form of **18c** was added HCl (4.0 M EtOAc solution, 1.50 mL, 6.00 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was concentrated in vacuo. IPE/EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (112 mg, 31%) as a yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.95 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.76–2.92 (5H, m), 2.97–3.13 (2H, m), 3.18–3.33 (2H, m), 3.34–3.55 (4H, m), 3.56–3.89 (6H, m), 3.96–4.62 (9H, m), 6.88–7.01 (1H, m), 7.18–7.52 (3H, m), 7.61–7.73 (1H, m), 7.84 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.2 Hz), 7.91–8.02 (1H, m), 8.16–8.60 (2H, m), 9.16–9.66 (1H, m), 9.77–10.41 (1H, m), 10.93 (1H, br s), 12.05 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 611; *Anal.* Calcd for C₂₉H₄₂N₁₀O₃S.4.3HCl.4.5H₂O: C, 41.04; H, 6.57; N, 16.51; S, 3.78; Cl, 17.96. Found: C, 41.20; H, 6.71; N, 16.31; S, 3.60; Cl, 17.86.

***tert*-Butyl {2-[(5-bromo-2-chloropyrimidin-4-yl)amino]benzene-1-sulfonyl}ethylcarbamate (20)**

To a solution of *tert*-butyl (2-aminobenzene-1-sulfonyl)ethylcarbamate (**19**⁴⁴⁾, 15.0 g, 49.9 mmol) in THF (120 mL) was added NaH (2.40 g, 54.9 mmol, 55% oil

dispersion) in an ice-water bath. After stirring at room temperature for 1 h, 5-bromo-2,4-dichloropyrimidine (13.7 g, 59.9 mmol) was added to the mixture. After stirring at 50 °C for 12 h, the mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified twice by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 95:5 to 50:50) to give the product (6.97 g, 28%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.30–1.40 (12H, m), 3.89 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 7.24–7.31 (1H, m), 7.61–7.69 (1H, m), 7.88 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.6 Hz), 8.38 (1H, s), 8.42 (1H, dd, *J* = 8.4, 1.0 Hz), 9.59 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 491.

2-({5-Bromo-2-[4-(1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl)-3-methoxyanilino]pyrimidin-4-yl}amino)-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (22)

To a solution of **20** (1.45 g, 2.95 mmol) in NMP/IPA (16 mL, 1:1) were added DIPEA (1.26 mL, 7.38 mmol) and 4-(1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl)-3-methoxyaniline (**21**⁴⁵), 1.01 g, 3.84 mmol). After stirring at 150 °C under microwave irradiation for 14 h, the mixture was diluted with H₂O and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 90:10 to 0:100) to give the product (964 mg, 53%) as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.99–1.09 (3H, m), 1.85–1.99 (4H, m), 2.95–3.06 (2H, m), 3.06–3.17 (4H, m), 3.73 (3H, s), 3.97–4.05 (4H, m), 4.48 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 6.81–6.93 (2H, m), 6.95–7.11 (2H, m), 7.16–7.25 (1H, m), 7.48–7.56 (1H, m), 7.96 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.14–8.27 (1H, m), 8.41 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.97 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 619, 621.

2-({5-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-[3-methoxy-4-(4-oxopiperidin-1-yl)anilino]pyrimidin-4-yl}amino)-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (23)

To a solution of **22** (188 mg, 0.303 mmol) in 1,4-dioxane (3.8 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (35.1 mg, 0.0303 mmol), 3,5-dimethoxyphenylbionic acid (110 mg, 0.604 mmol), and 2 M Na₂CO₃ *aq.* (379 μL, 0.759 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 110 °C for 2 h, the mixture was diluted with EtOAc and passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 95:5 to 0:100) to give a pale yellow solid. To this product were added AcOH (4.00 mL, 48.0 mmol) and H₂O (8.0 mL). The mixture was stirred at 100 °C for 12 h and then concentrated *in vacuo*. The residue was neutralized with Na₂CO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 99:1 to 80:20) to give the product (190 mg, 100%) as a brown solid. MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 633.

2-[[5-(3,5-Dimethoxyphenyl)-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl]amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (24)

To a solution of **23** (190 mg, 0.300 mmol) in CH₂Cl₂ (4.0 mL) was added *N*-methylpiperazine (165 μL, 1.50 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, NaBH(OAc)₃ (79.6 mg, 0.375 mmol) was added. After stirring at room temperature for 1 h, NaBH(OAc)₃ (79.6 mg, 0.375 mmol) was added. After further stirring at room temperature for 12 h, the mixture was diluted with NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH = 100:0 to 80:20). IPE/EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (76 mg, 35%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.91 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.45–1.60 (2H, m), 1.73–1.86 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.20–2.57 (11H, m), 2.68–2.78 (2H, m), 3.25–3.36 (2H, m), 3.51–3.65 (3H, m), 3.79 (6H, s), 6.51 (1H, dd, *J* = 2.3, 2.2 Hz), 6.66 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.72–6.80 (1H, m), 7.15–7.24 (2H, m), 7.33 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.48–7.57 (1H, m), 7.67 (1H, t, *J* = 5.7 Hz), 7.74 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz), 8.10 (1H, s), 8.42 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.78 (1H, s), 9.22 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 717; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₇H₄₉N₈O₅S [M+H]⁺: 717.3541. Found: 717.3541.

Ethyl 4-[2-(ethylsulfamoyl)anilino]-2-(methylsulfanyl)pyrimidine-5-carboxylate (27)

To a solution of ethyl 4-chloro-2-(methylsulfanyl)pyrimidine-5-carboxylate (**25**, 4.65 g, 20.0 mmol) in toluene (58 mL) were added DIPEA (3.77 mL, 22.0 mmol) and 2-amino-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (**26**, 4.01 g, 20.0 mmol). After stirring at 110 °C for 20 h, the solvent was replaced with NMP. After stirring at 130 °C for 6 h, the mixture was poured into H₂O. The resulting precipitate was filtered, washed with Et₂O and dried to give the product (5.61 g, 71%) as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.02 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.41 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 2.46 (3H, s), 2.94–3.08 (2H, m), 4.44 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 4.89 (1H, br s), 7.23–7.32 (1H, m), 7.54–7.60 (1H, m), 8.03 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 8.24 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.84 (1H, s), 10.67 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 397.

4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-2-(methylsulfanyl)pyrimidine-5-carboxylic acid (28)

To a solution of **27** (1.98 g, 5.00 mmol) in MeOH/THF (20 mL, 1:1) was added 1 M NaOH *aq.* (20.0 mL, 20.0 mmol). After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was neutralized with 1 M HCl *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic

layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Et₂O was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (1.50 g, 81%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.84 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.36 (3H, s), 2.75–2.85 (2H, m), 7.31–7.39 (1H, m), 7.59–7.68 (2H, m), 7.85 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.2 Hz), 8.02 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.74 (1H, s), 10.72 (1H, s), 13.54 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 369.

4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-*N*-methoxy-*N*-methyl-2-(methylsulfanyl)pyrimidine-5-carboxamide (29)

To a solution of **28** (400 mg, 1.09 mmol) in DMF (8.00 mL) were added *N,O*-dimethylhydroxyamine hydrochloride (159 mg, 1.63 mmol), EDCI hydrochloride (312 mg, 1.63 mmol), HOBt (220 mg, 1.63 mmol) and Et₃N (303 μL, 2.17 mmol). After stirring at room temperature for 12 h, the mixture was diluted with H₂O. The resulting precipitate was filtered and dried to give the product (429 mg, 96%) as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 0.96 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.51 (3H, s), 2.87–3.01 (2H, m), 3.44 (3H, s), 3.66 (3H, s), 5.85–5.98 (1H, m), 7.19–7.31 (1H, m), 7.53–7.62 (1H, m), 8.04 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.39 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 8.58 (1H, s), 9.53 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 412.

2-[[5-(3,5-Dimethoxybenzoyl)-2-(methylsulfanyl)pyrimidin-4-yl]amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (30)

To a solution of **29** (200 mg, 0.486 mmol) in THF (6.0 mL) was added 3,5-dimethoxyphenylmagnesium bromide (1.0 M THF solution, 1.70 mL, 1.70 mmol) at –78 °C. After stirring the mixture at –78 °C for 2 h and warming to room temperature, additional 3,5-dimethoxyphenylmagnesium bromide (1.0 M THF solution, 0.486 mL, 0.486 mmol) was added to the mixture at –78 °C. This sequence of steps was repeated twice with two further additions of 3,5-dimethoxyphenylmagnesium bromide (1.0 M THF solution, 0.972 mL, 0.972 mmol then 1.0 M THF solution, 1.94 mL, 1.94 mmol). After stirring at –78 °C for 2 h, the mixture was quenched with sat. NH₄Cl *aq.* and warmed to room temperature. The mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl₃) to give the product (150 mg, 63%) as a colorless solid. ¹H NMR (CDCl₃): δ 1.05 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.49 (3H, s), 3.00–3.11 (2H, m), 3.84 (6H, s), 5.17 (1H, t, *J* = 5.9 Hz), 6.68 (1H, dd, *J* = 2.4, 2.2 Hz), 6.83 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.26–7.34 (1H, m), 7.56–7.65 (1H, m), 8.06 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz), 8.31 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.0 Hz), 8.58 (1H, s), 11.17 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 489.

2-[[5-(3,5-Dimethoxybenzoyl)-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl]amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (32)

To a solution of **30** (150 mg, 0.307 mmol) in CH₂Cl₂ (4.0 mL) was added *m*-CPBA (75%, 77.7 mg, 0.338 mmol) in an ice-water bath. After stirring in an ice-water bath for 2 h, the mixture was quenched with NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give 2-[[5-(3,5-dimethoxybenzoyl)-2-(methanesulfinyl)pyrimidin-4-yl]amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (147 mg, 95%) as a brown solid, which was used in the next reaction without further purification. To a solution of 2-[[5-(3,5-dimethoxybenzoyl)-2-(methanesulfinyl)pyrimidin-4-yl]amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (147 mg, 0.291 mmol) in IPA (4.0 mL) was added 3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]aniline (**31**, 97.6 mg, 0.320 mmol). After stirring at 90 °C for 12 h, the mixture was diluted with NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH = 100:0 to 80:20) and then purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20). EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (89.0 mg, 39%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.83–0.97 (3H, m), 1.44–1.58 (2H, m), 1.74–1.84 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.20–2.57 (11H, m), 2.79–2.90 (2H, m), 3.24–3.44 (5H, m), 3.82 (6H, s), 6.58–6.80 (4H, m), 7.02–7.16 (1H, m), 7.16–7.29 (1H, m), 7.32–7.43 (1H, m), 7.53–7.70 (2H, m), 7.87 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz), 7.95–8.09 (1H, m), 8.43 (1H, s), 9.96 (1H, br s), 11.35 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 745.

2-[(5-[(3,5-Dimethoxyphenyl)(hydroxy)methyl]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl)amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (33)

To a solution **32** (110 mg, 0.148 mmol) in THF/MeOH (6.0 mL, 2:1) was added NaBH₄ (10.0 mg, 0.264 mmol) in an ice-water bath. After stirring at room temperature for 1 h, NaBH₄ (10.0 mg, 0.264 mmol) was added to the mixture in an ice-water bath. After stirring at room temperature for 2 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20). IPE/EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (71 mg, 64%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.91 (3H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.43–1.59 (2H, m), 1.72–1.85 (2H, m), 2.16 (3H, s), 2.20–2.55 (11H, m), 2.78–2.90 (2H, m), 3.19–3.40 (2H, m), 3.46–3.55 (3H, m), 3.69 (6H, s), 5.69 (1H, d, *J* = 3.7 Hz), 6.33 (1H, d, *J* = 3.9 Hz), 6.37 (1H, dd, *J* = 2.4, 2.2 Hz), 6.64 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.69 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.13 (1H, d, *J* =

8.0 Hz), 7.16–7.24 (1H, m), 7.28 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.41 (1H, t, $J = 5.7$ Hz), 7.46–7.54 (1H, m), 7.80 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz), 7.92 (1H, s), 8.15 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 9.05 (1H, s), 9.18 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 747.

2-[(5-[(3,5-Dimethoxyphenyl)methyl]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl)amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (34)

To a solution of **33** (53.0 mg, 71.0 μ mol) in CH_2Cl_2 (2.0 mL) were added triethylsilane (113 μ L, 0.710 mmol) and TFA (272 μ L, 3.55 mmol) in an ice-water bath under an argon atmosphere. After stirring at room temperature for 18 h, additional triethylsilane (113 μ L, 0.710 mmol) and TFA (1.00 mL, 13.1 mmol) were added to the mixture in an ice-water bath. After stirring at room temperature for 6 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH = 100:0 to 80:20) and then purified by column chromatography on silica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 100:0$ to 80:20). IPE/EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (16 mg, 31%) as a colorless solid. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$): δ 0.91 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.45–1.60 (2H, m), 1.74–1.85 (2H, m), 2.18 (3H, s), 2.22–2.57 (11H, m), 2.69–2.81 (2H, m), 3.25–3.36 (2H, m), 3.60 (3H, s), 3.69 (6H, s), 3.78 (2H, s), 6.34 (1H, dd, $J = 2.2, 2.2$ Hz), 6.43 (2H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.75 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.15–7.23 (2H, m), 7.28 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 7.49–7.57 (1H, m), 7.78 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz), 7.88 (1H, t, $J = 5.7$ Hz), 8.01 (1H, s), 8.56 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 8.80 (1H, s), 9.04 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 731; HRMS (ESI) m/z Calcd for $\text{C}_{38}\text{H}_{51}\text{N}_8\text{O}_5\text{S}$ $[M+H]^+$: 731.3698. Found: 731.3688.

2-[(5-Bromo-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl)amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (35a)

To a solution of **20** (1.00 g, 2.03 mmol) in IPA (10 mL) were added **31** (650 mg, 2.14 mmol) and methanesulfonic acid (0.396 mL, 6.10 mmol). After stirring at 130 $^\circ\text{C}$ under microwave irradiation for 1 h, the mixture was quenched with NaHCO_3 *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with EtOAc and stirred under reflux conditions. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (1.03 g, 77%) as a colorless solid. ^1H NMR (CDCl_3): δ 1.04 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.73–1.96 (4H, m), 2.30 (3H, s), 2.34–2.75 (11H, m), 2.95–3.06 (2H, m), 3.43–3.55 (2H, m), 3.72 (3H, s), 4.44 (1H, t, $J = 6.1$ Hz), 6.80–6.88 (2H, m), 6.98 (1H, dd, $J = 8.5, 2.5$ Hz), 7.06 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.18–7.24 (1H, m), 7.47–7.55 (1H, m), 7.96 (1H, dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz), 8.22 (1H, s), 8.39–8.44 (1H, m), 8.97 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M-H]^-$ 657, 659.

2-((5-Bromo-2-[3-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)anilino]pyrimidin-4-yl)amino)-N-ethylbenzene-1-sulfonamide (35b)

Compound **35b** was prepared from **20** and **2** in 73% yield using a similar approach to that described for **35a**. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.96 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.21 (3H, s), 2.37–2.53 (4H, m), 2.79–2.97 (6H, m), 3.59 (3H, s), 6.76 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.16 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.19–7.24 (1H, m), 7.24–7.32 (1H, m), 7.53–7.61 (1H, m), 7.82 (1H, dd, *J* = 7.8, 1.6 Hz), 7.85–7.93 (1H, m), 8.32 (1H, s), 8.39–8.52 (1H, m), 9.15 (1H, s), 9.31 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 576, 578; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₄H₃₁BrN₇O₃S [M+H]⁺: 576.1387. Found: 576.1381.

2-[(5-[(3,5-Dimethoxyphenyl)ethynyl]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl)amino]-N-ethylbenzene-1-sulfonamide (36)

To a solution of **35a** (900 mg, 1.36 mmol) in DMF (18 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (315 mg, 0.273 mmol), 1-ethynyl-3,5-dimethoxybenzene (0.221 g, 1.36 mmol), and Et₃N (951 μL, 6.82 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 120 °C for 0.5 h, additional 1-ethynyl-3,5-dimethoxybenzene (1.98 g, 12.2 mmol) in DMF (18 mL) was added dropwise to the mixture over 4 h. After stirring at 120 °C for 2 h, the mixture was diluted with EtOAc and passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) and then purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH = 100:0 to 80:20). The residue was diluted with EtOAc and stirred under reflux conditions. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (771 mg, 76%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.95 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.46–1.60 (2H, m), 1.75–1.85 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20–2.56 (11H, m), 2.83–2.94 (2H, m), 3.26–3.38 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.77 (6H, s), 6.53 (1H, dd, *J* = 2.4, 2.4 Hz), 6.77–6.86 (3H, m), 7.16–7.30 (3H, m), 7.57 (1H, t, *J* = 7.4 Hz), 7.82 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz), 7.93–8.02 (1H, m), 8.40 (1H, s), 8.55–8.75 (1H, m), 9.52 (2H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 741; *Anal.* Calcd for C₃₉H₄₈N₈O₅S. 0.3EtOAc.0.04CHCl₃: C, 62.59; H, 6.58; N, 14.51; S, 4.15; Cl, 0.55. Found: C, 62.64; H, 6.61; N, 14.51; S, 4.08; Cl, 0.50.

2-[(5-[2-(3,5-Dimethoxyphenyl)ethyl]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl)amino]-N-ethylbenzene-1-sulfonamide (37)

To a solution of **36** (200 mg, 0.270 mmol) in THF/MeOH (8.0 mL, 1:1) was added 10% Pd/C (14.4 mg, 13.5 μmol) under an argon atmosphere. After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 6 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. To the residue

in THF/MeOH (8.0 mL, 1:1) was added 10% Pd/C (14.4 mg, 13.5 μ mol) under an argon atmosphere. After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (2.5 atm) for 4 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with EtOAc and stirred under reflux conditions. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (102 mg, 51%) as a pale yellow solid. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 0.92–1.00 (3H, m), 1.45–1.60 (2H, m), 1.74–1.85 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.19–2.56 (11H, m), 2.69–2.90 (6H, m), 3.26–3.36 (2H, m), 3.61 (3H, s), 3.71 (6H, s), 6.30 (1H, dd, J = 2.4, 2.2 Hz), 6.50 (2H, d, J = 2.4 Hz), 6.76 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.15–7.24 (2H, m), 7.29 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.52–7.59 (1H, m), 7.80 (1H, dd, J = 7.8, 1.6 Hz), 7.95 (1H, t, J = 5.5 Hz), 8.02 (1H, s), 8.69 (1H, d, J = 8.4 Hz), 8.98 (1H, s), 9.01 (1H, s); MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 745; HRMS (ESI) m/z Calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{53}\text{N}_8\text{O}_5\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 745.3854. Found: 745.3850; *Anal.* Calcd for $\text{C}_{39}\text{H}_{52}\text{N}_8\text{O}_5\text{S}\cdot 0.2\text{EtOAc}\cdot 1.7\text{H}_2\text{O}$: C, 60.3; H, 7.2; N, 14.1; S, 4.0. Found: C, 60.3; H, 7.0; N, 14.0; S, 3.8.

2-[(2-Chloro-5-nitropyrimidin-4-yl)amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (38)

A mixture of **26** (530 mg, 2.65 mmol) and 2,4-dichloro-5-nitropyrimidine (510 mg, 2.63 mmol) in DMAc (5.0 mL) was stirred at room temperature for 3 h. The mixture was diluted with NaHCO_3 *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 100:10 to 75:25) to give the product (720 mg, 77%) as a yellow solid. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 0.85 (3H, t, J = 7.2 Hz), 2.78 (2H, qd, J = 7.2, 5.8 Hz), 7.46–7.53 (1H, m), 7.71–7.80 (2H, m), 7.89–7.98 (2H, m), 9.31 (1H, s), 10.78 (1H, s); MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 358.

N-Ethyl-2-[(2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}-5-nitropyrimidin-4-yl)amino]benzene-1-sulfonamide (39a)

Compound **39a** was prepared from **31** and **38** in 87% yield using a similar approach to that described for **18a**. ^1H NMR (DMSO- d_6): δ 0.77–0.88 (3H, m), 1.43–1.58 (2H, m), 1.74–1.84 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.18–2.57 (11H, m), 2.71–2.82 (2H, m), 3.26–3.35 (2H, m), 3.39 (3H, br s), 6.64 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.05 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.14 (1H, br s), 7.36–7.47 (1H, m), 7.53–7.66 (1H, m), 7.73–7.83 (1H, m), 7.88 (1H, d, J = 7.0 Hz), 7.94–8.07 (1H, m), 9.13 (1H, s), 10.37 (1H, br s), 10.82 (1H, br s); MS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 626.

2-[(5-Amino-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-4-yl)amino]-*N*-ethylbenzene-1-sulfonamide (39b)

To a solution of **39a** (2.21 g, 3.53 mmol) in EtOH/THF (70 mL, 4:3) was added 10% Pd/C (50% wet, 1.58 g, 0.742 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 6 h, the mixture was

passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ aq. = 100:0:0 to 90:9:1) to give the product (2.08 g, 99%) as a brown solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.93 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.45–1.59 (2H, m), 1.73–1.85 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.17–2.54 (11H, m), 2.83 (2H, q, *J* = 7.0 Hz), 3.24–3.34 (2H, m), 3.62 (3H, s), 4.06 (2H, s), 6.74 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.12–7.22 (2H, m), 7.27 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.52–7.60 (1H, m), 7.75–7.83 (3H, m), 8.67 (1H, s), 8.71 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 9.01 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 596.

***N*-(4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-3,5-dimethoxybenzamide (40a)**

To a solution of **39b** (150 mg, 0.252 mmol) in THF (5.0 mL) were added DIPEA (50.0 μL, 0.292 mmol) and 3,5-dimethoxybenzoyl chloride (60.0 mg, 0.299 mmol). After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was quenched with sat. NaHCO₃ aq. and extracted with CHCl₃/IPA (3:1). The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 98:2 to 85:15). Et₂O was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (93 mg, 49%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.90 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.46–1.61 (2H, m), 1.75–1.86 (2H, m), 2.17 (3H, s), 2.22–2.59 (11H, m), 2.75–2.85 (2H, m), 3.26–3.38 (2H, m), 3.66 (3H, s), 3.83 (6H, s), 6.73 (1H, dd, *J* = 2.4, 2.2 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.14–7.29 (5H, m), 7.52–7.63 (2H, m), 7.79 (1H, dd, *J* = 8.0, 1.6 Hz), 8.10 (1H, s), 8.78 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 9.20 (1H, s), 9.25 (1H, s), 9.88 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 760; *Anal.* Calcd for C₃₈H₄₉N₉O₆S.0.05CHCl₃.1.2H₂O: C, 58.03; H, 6.59; N, 16.01; S, 4.07; Cl, 0.68. Found: C, 57.98; H, 6.50; N, 15.86; S, 4.03; Cl, 0.60.

***N*-(4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-2,5-dimethoxybenzamide (40b)**

Compound **40b** was prepared from **39b** and 2,5-dimethoxybenzoic acid using a similar approach to that described for **40f**. MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 760.

***N*-(4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-2,3-dimethoxybenzamide (40c)**

Compound **40c** was prepared from **39b** and 2,3-dimethoxybenzoic acid using a similar approach to that described for **40f**. MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 760.

***N*-(4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-3,5-dihydroxybenzamide (40d)**

Compound **40d** was prepared from **39b** and 3,5-dihydroxybenzoic acid using a

similar approach to that described for **40f**. MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 732.

***N*-(4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-3,5-dimethylbenzamide (40e)**

Compound **40e** was prepared from **39b** and 3,5-dimethylbenzoic acid using a similar approach to that described for **40f**. MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 728.

***N*-(4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-4,6-dimethoxypyrimidine-2-carboxamide (40f)**

To a solution of **39b** (278 mg, 0.467 mmol) in DMF (5.0 mL) were added 4,6-dimethoxypyrimidine-2-carboxylic acid (103 mg, 0.560 mmol), DIPEA (160 μ L, 0.935 mmol) and HATU (236 mg, 0.621 mmol) in an ice-water bath. After stirring at room temperature overnight, the mixture was quenched with NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 90:9:1). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried. To the precipitate was added EtOH/EtOAc/MeCN, and the mixture was heated to 100 °C. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (96 mg, 27%) as a colorless solid. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 0.90 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.46–1.61 (2H, m), 1.74–1.86 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20–2.58 (11H, m), 2.74–2.85 (2H, m), 3.25–3.39 (2H, m), 3.67 (3H, s), 4.03 (6H, s), 6.48 (1H, s), 6.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.16–7.29 (3H, m), 7.51–7.62 (2H, m), 7.77 (1H, dd, *J* = 7.9, 1.5 Hz), 8.13 (1H, s), 8.74–8.87 (1H, m), 9.14 (1H, br s), 9.27 (1H, s), 10.14 (1H, br s); MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 762; *Anal.* Calcd for C₃₆H₄₇N₁₁O₆S.1.7H₂O: C, 54.56; H, 6.41; N, 19.44; S, 4.05. Found: C, 54.55; H, 6.38; N, 19.45; S, 4.02.

***N*-(4-[2-(Ethylsulfamoyl)anilino]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-2,6-dimethoxypyrimidine-4-carboxamide (40g)**

Compound **40g** was prepared from **39b** and 2,6-dimethoxypyrimidine-4-carboxylic acid using a similar approach to that described for **40f**. MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 762.

Chapter 2

***N*²-{3-Methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}-5-nitro-*N*⁴-phenylpyrimidine-2,4-diamine (42a)**

A mixture of 2-chloro-5-nitro-*N*-phenylpyrimidin-4-amine (**41a**, 260 mg, 1.04 mmol), 3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]aniline (**31**, 316

mg, 1.04 mmol), and AcOH (4.00 mL) was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with water, NaOH (1.0 M aqueous solution), and sat. NaHCO₃ aq. in an ice-water bath and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ aq. = 100:0:0 to 90:9:1) to give the product (450 mg, 84%) as a red solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.46–1.60 (2H, m), 1.72–1.88 (2H, m), 2.16 (3H, s), 2.20–2.58 (11H, m), 3.24–3.40 (2H, m), 3.42–3.56 (3H, m), 6.63–6.73 (1H, m), 7.03–7.17 (2H, m), 7.17–7.29 (1H, m), 7.30–7.44 (2H, m), 7.52–7.66 (2H, m), 9.08 (1H, s), 10.19–10.41 (2H, m); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 519.

***N*⁴-[2-(Methanesulfonyl)ethyl]-*N*²-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}-5-nitropyrimidine-2,4-diamine (42b)**

Compound **42b** was prepared from 2-chloro-*N*-[2-(methanesulfonyl)ethyl]-5-nitropyrimidin-4-amine (**41b**) and **31** in 62% yield using a similar approach to that described for **42a**. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.47–1.61 (2H, m), 1.74–1.85 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20–2.56 (11H, m), 3.00 (3H, br s), 3.28–3.39 (2H, m), 3.45–3.59 (2H, m), 3.77 (3H, s), 3.94–4.06 (2H, m), 6.87 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.27 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.31–7.40 (1H, m), 8.97 (1H, s), 9.05 (1H, br s), 10.27 (1H, br s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 549.

***N*-{3-Methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}-5-nitropyrimidin-2-amine (42c)**

To a mixture of **31** (973 mg, 3.20 mmol) in EtOH (10.2 mL) was added MsOH (0.415 mL, 6.39 mmol). After stirring at room temperature for 20 min, 2-chloro-5-nitropyrimidine (**41c**, 510 mg, 3.20 mmol) was added to the mixture. After stirring at 100 °C for 4 h, the mixture was quenched with sat. NaHCO₃ aq. and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give the product (858 mg, 63%) as a brown solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.74–1.95 (4H, m), 2.30 (3H, s), 2.36–2.74 (11H, m), 3.46–3.59 (2H, m), 3.88–3.92 (3H, m), 6.91–6.97 (1H, m), 7.04–7.09 (1H, m), 7.23–7.29 (1H, m), 7.62 (1H, br s), 9.17 (2H, br s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 428.

***N*²-{3-Methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}-*N*⁴-phenylpyrimidine-2,4,5-triamine (43a)**

To a mixture of **42a** (450 mg, 0.868 mmol) in EtOH (15.0 mL) and THF (25.0 mL) was added 10% Pd/C (50% wet, 110 mg). After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 3 h, the mixture was passed through a Celite

pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. To the reaction mixture were added EtOH (12.0 mL), THF (12.0 mL) and 10% Pd/C (50% wet, 240 mg). After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 7 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give the product (506 mg, quantitative yield) as a grey solid. MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 489.

***N*⁴-[2-(Methanesulfonyl)ethyl]-*N*²-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidine-2,4,5-triamine (43b)**

To a mixture of **42b** (710 mg, 1.29 mmol) in EtOH (15.0 mL) and THF (30.0 mL) was added 10% Pd/C (50% wet, 331 mg). After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 7 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was diluted with CHCl₃ and dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 90:9:1) to give the product (710 mg, quantitative yield) as a grey solid. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.45–1.60 (2H, m), 1.72–1.85 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.19–2.57 (11H, m), 3.02 (3H, s), 3.22–3.34 (2H, m), 3.45 (2H, t, *J* = 6.7 Hz), 3.73 (3H, s), 3.76–3.85 (2H, m), 3.98 (2H, s), 6.62 (1H, t, *J* = 5.8 Hz), 6.74 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.24 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz), 7.30 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.42 (1H, s), 8.29 (1H, s); MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 519.

***N*²-{3-Methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidine-2,5-diamine (43c)**

To a mixture of **42c** (858 mg, 2.01 mmol) in EtOH (15.0 mL) was added 10% Pd/C (55% wet, 107 mg). After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 12 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give the product (567 mg, 71%) as a brown solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.73–1.93 (4H, m), 2.29 (3H, s), 2.34–2.74 (11H, m), 3.25 (2H, s), 3.40–3.56 (2H, m), 3.87 (3H, s), 6.72 (1H, s), 6.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.99 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.2 Hz), 7.20 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.01 (2H, s); MS (APCI/ESI) m/z [M+H]⁺ 398.

***N*-(4-Anilino-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-3,5-dimethoxybenzamide (44a)**

To a mixture of **43a** (254 mg, 0.520 mmol) in THF (10.0 mL) were added DIPEA (98.3 μ L, 0.574 mmol) and 3,5-dimethoxybenzoyl chloride (120 mg, 0.598 mmol). After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was quenched with sat. NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine,

dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ aq. = 100:0:0 to 90:9:1). EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (103 mg, 30%) as a grey solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.48–1.59 (2H, m), 1.76–1.83 (2H, m), 2.15 (3H, s), 2.20–2.58 (11H, m), 3.26–3.37 (2H, m), 3.59 (3H, s), 3.82 (6H, s), 6.71–6.77 (2H, m), 7.02–7.07 (1H, m), 7.20–7.32 (6H, m), 7.63–7.72 (2H, m), 7.97 (1H, s), 8.59 (1H, s), 9.01 (1H, s), 9.57 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 653; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₆H₄₅N₈O₄ [M+H]⁺: 653.3558. Found: 653.3548; *Anal.* Calcd for C₃₆H₄₄N₈O₄.0.6H₂O: C, 65.16; H, 6.87; N, 16.89. Found: C, 65.11; H, 6.94; N, 16.87.

***N*-(4-[[2-(Methanesulfonyl)ethyl]amino]-2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-3,5-dimethoxybenzamide (44b)**

A mixture of **43b** (200 mg, 0.386 mmol), 3,5-dimethoxybenzoic acid (84.3 mg, 0.463 mmol), DIPEA (132 μL, 0.771 mmol), and HATU (182 mg, 0.479 mmol) in DMF (4.00 mL) was stirred at room temperature overnight. The mixture was quenched with water and sat. NaHCO₃ aq. and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified twice by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ aq. = 100:0:0 to 90:9:1). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (86 mg, 33%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.45–1.62 (2H, m), 1.75–1.84 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20–2.57 (11H, m), 3.01 (3H, s), 3.26–3.35 (2H, m), 3.42 (2H, t, *J* = 6.8 Hz), 3.74–3.84 (11H, m), 6.70 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 6.77–6.83 (1H, m), 6.93–7.02 (1H, m), 7.15 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.30–7.35 (2H, m), 7.77 (1H, s), 8.91 (1H, s), 9.47 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 683; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₃H₄₇N₈O₆S [M+H]⁺: 683.3334. Found: 683.3324; *Anal.* Calcd for C₃₃H₄₆N₈O₆S.0.08IPE.1.7H₂O: C, 55.72; H, 7.06; N, 15.53; S, 4.44. Found: C, 55.79; H, 6.91; N, 15.34; S, 4.39.

3,5-Dimethoxy-*N*-(2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)benzamide (44c)

Compound **44c** was prepared from **43c** in 51% yield using a similar approach to that described for **44b**. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.48–1.61 (2H, m), 1.75–1.85 (2H, m), 2.14–2.71 (14H, m), 3.25–3.37 (2H, m), 3.77 (3H, s), 3.83 (6H, s), 6.73 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 6.82 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.12 (2H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.28 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.3 Hz), 7.36 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.73 (2H, s), 9.38 (1H, s), 10.21 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 562; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₀H₄₀N₇O₄ [M+H]⁺:

562.3136. Found: 562.3134; *Anal.* Calcd for C₃₀H₃₉N₇O₄·0.14IPE·1.2H₂O: C, 61.98; H, 7.31; N, 16.41. Found: C, 62.01; H, 7.45; N, 16.23.

***N*⁵-[(3,5-Dimethoxyphenyl)methyl]-*N*²-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidine-2,5-diamine (44d)**

To a mixture of **43c** (150 mg, 0.377 mmol) in CH₂Cl₂ (6.00 mL) were added 3,5-dimethoxybenzaldehyde (56.4 mg, 0.340 mmol) and NaBH(OAc)₃ (120 mg, 0.566 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was quenched with water and sat. NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified twice by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 90:9:1) to give the mixture.

To the mixture in MeOH (5.00 mL) was added NaBH₄ (57.1 mg, 1.51 mmol). After stirring at room temperature for 6 h, the mixture was quenched with water and sat. NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 90:9:1). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (33 mg, 16%) as an yellow solid. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.43–1.61 (2H, m), 1.69–1.86 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.18–2.57 (11H, m), 3.21–3.36 (2H, m), 3.68–3.75 (9H, m), 4.19 (2H, d, *J* = 6.3 Hz), 5.89 (1H, t, *J* = 6.3 Hz), 6.36 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 6.55 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.74 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.18 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.29 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.92 (2H, s), 8.74 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 548

HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₀H₄₂N₇O₃ [M+H]⁺: 548.3344. Found: 548.3341; *Anal.* Calcd for C₃₀H₄₁N₇O₃·0.1EtOAc: C, 65.6; H, 7.6; N, 17.6. Found: C, 65.5; H, 7.6; N, 17.5.

5-Bromo-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (46)

To a mixture of 5-bromo-2-chloropyrimidine (**45**, 3.00 g, 15.5 mmol) and **31** (3.15 g, 10.3 mmol) in IPA (31.5 mL) was added MsOH (2.01 mL, 31.0 mmol). After stirring at 90 °C for 12 h and then 110 °C for 6 h, the mixture was quenched with NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 99:1 to 80:20) to give the product (3.76 g, 79%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.72–1.93 (4H, m), 2.29 (3H, s), 2.36–2.73 (11H, m), 3.45–3.56 (2H, m), 3.87 (3H, s), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.00 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.09 (1H, s), 7.19 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.39 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 461, 463.

5-[(3,5-Dimethoxyphenyl)ethynyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (47)

To a mixture of **46** (300 mg, 0.650 mmol), Pd(PPh₃)₄ (75.1 mg, 65.0 μmol), CuI (6.19 mg, 32.5 μmol), 1-ethynyl-3,5-dimethoxybenzene (316 mg, 1.95 mmol) in DMF (6.00 mL) was added Et₃N (223 μL, 1.30 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 110 °C for 4 h, the mixture was diluted with EtOAc and passed through a Celite pad. To the filtrate was added NaHCO₃ *aq.* and the mixture was extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give crude material, which was purified again by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH = 100:0 to 80:20) to give the product (328 mg, 93%) as a yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.73–1.96 (4H, m), 2.30 (3H, s), 2.36–2.74 (11H, m), 3.45–3.58 (2H, m), 3.81 (6H, s), 3.89 (3H, s), 6.47 (1H, t, *J* = 2.3 Hz), 6.67 (2H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.92 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.04 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.3 Hz), 7.09 (1H, br s), 7.23–7.28 (1H, m), 8.52 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 543.

5-[2-(3,5-Dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (48)

To a mixture of **47** (328 mg, 0.604 mmol) in MeOH (10.0 mL) and THF (10.0 mL) was added 10% Pd/C (50% wet, 64.0 mg) under an argon atmosphere. After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (3.0 atm) for 3 h, 10% Pd/C (50% wet, 64.0 mg) was added to the mixture. After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (3.0 atm) for 5 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20), diluted with EtOAc and stirred under heating condition. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (180 mg, 54%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.46–1.59 (2H, m), 1.74–1.83 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.19–2.54 (11H, m), 2.71–2.82 (4H, m), 3.26–3.36 (2H, m), 3.70 (6H, s), 3.74 (3H, s), 6.30 (1H, t, *J* = 2.3 Hz), 6.38 (2H, d, *J* = 2.3 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.24 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.3 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.26 (2H, s), 9.22 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 547; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₁H₄₃N₆O₃ [M+H]⁺: 547.3391. Found: 547.3383; *Anal.* Calcd for C₃₁H₄₂N₆O₃·0.4H₂O: C, 67.22; H, 7.79; N, 15.17. Found: C, 67.40; H, 7.77; N, 15.00.

***N*-(2-Chloropyrimidin-5-yl)-3,5-dimethoxybenzamide (50a)**

Compound **13a** was prepared from 2-chloropyrimidin-5-amine (**49a**) in 77% yield using a similar approach to that described for **44a**. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.83 (6H, s), 6.78 (1H, t, *J* = 2.3 Hz), 7.14 (2H, d, *J* = 2.3 Hz), 9.13 (2H, s), 10.70 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 294.

***N*-(2-Chloropyrimidin-5-yl)-3,5-dimethoxy-N-methylbenzamide (50b)**

To a mixture of **50a** (690 mg, 2.35 mmol) in DMF (10.0 mL) was added NaH (113 mg, 2.58 mmol, 55% oil dispersion) in an ice-water bath. After stirring in an ice-water bath for 15 min, iodomethane (220 μ L, 3.53 mmol) was added to the mixture. After stirring at room temperature for 4 h, the mixture was quenched with water in an ice-water bath and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 100:0 to 50:50) to give the product (530 mg, 73%) as a yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.38 (3H, s), 3.68 (6H, s), 6.48–6.53 (3H, m), 8.73 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 308.

2-Chloro-5-[(3,5-dimethoxyphenoxy)methyl]pyrimidine (50c)

To a mixture of (2-chloropyrimidin-5-yl)methanol (**49b**, 120 mg, 0.805 mmol) in THF (2.40 mL) were added 3,5-dimethoxyphenol (186 mg, 1.21 mmol), ADDP (305 mg, 1.21 mmol), and *n*-Bu₃P (244 mg, 1.21 mmol) in an ice-water bath. After stirring at room temperature for 12 h, the insoluble material was removed by filtration. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give a residue, which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 90:10 to 0:100) to give the product (119 mg, 53%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.78 (6H, s), 5.03 (2H, s), 6.11–6.16 (3H, m), 8.70 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 281.

2-Chloro-5-[(3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]pyrimidine (50d)

To a mixture of 2-chloropyrimidin-5-ol (**49c**, 278 mg, 2.13 mmol) in DMF (3.00 mL) were added K₂CO₃ (453 mg, 3.28 mmol) and 3,5-dimethoxybenzyl bromide (541 mg, 2.34 mmol) in an ice-water bath. After stirring at room temperature for 7 h, the mixture was quenched with water and sat. NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 100:0 to 75:25) to give the product (360 mg, 60%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.75 (6H, s), 5.20 (2H, s), 6.48 (1H, t, *J* = 2.3 Hz), 6.63 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.60 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 281.

3,5-Dimethoxy-*N*-(2-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]anilino}pyrimidin-5-yl)-*N*-methylbenzamide (51a)

To a mixture of **50b** (195 mg, 0.634 mmol), **31** (295 mg, 0.969 mmol), *rac*-BINAP (119 mg, 0.191 mmol), and Cs₂CO₃ (619 mg, 1.90 mmol) in 1,4-dioxane (8.00 mL) was added Pd(OAc)₂ (39.0 mg, 0.174 mmol). After stirring at 100 °C for 3 h, the mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified twice by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 90:9:1). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (153 mg, 42%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.45–1.60 (2H, m), 1.72–1.84 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20–2.59 (11H, m), 3.22–3.39 (5H, m), 3.57–3.69 (6H, m), 3.73 (3H, s), 6.32–6.52 (3H, m), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.16–7.29 (2H, m), 8.32 (2H, br s), 9.47 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 576; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₁H₄₂N₇O₄ [M+H]⁺: 576.3293. Found: 576.3288; *Anal.* Calcd for C₃₁H₄₁N₇O₄.0.3IPE.1.2H₂O: C, 62.73; H, 7.64; N, 15.61. Found: C, 62.64; H, 7.40; N, 15.62.

5-[(3,5-Dimethoxyphenoxy)methyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (51b)

Compound **51b** was prepared from **50c** and **31** in 82% yield using a similar approach to that described for **51a**. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.47–1.60 (2H, m), 1.76–1.83 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.19–2.58 (11H, m), 3.26–3.36 (2H, m), 3.71 (6H, s), 3.76 (3H, s), 4.94 (2H, s), 6.12 (1H, t, *J* = 2.2 Hz), 6.20 (2H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.27 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.36 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.52 (2H, s), 9.50 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 549; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₀H₄₁N₆O₄ [M+H]⁺: 549.3184. Found: 549.3182; *Anal.* Calcd for C₃₀H₄₀N₆O₄.0.05EtOAc.0.04H₂O: C, 65.50; H, 7.37; N, 15.18. Found: C, 65.49; H, 7.43; N, 15.05.

5-[(3,5-Dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (51c)

Compound **51c** was prepared from **50d** and **31** in 33% yield using a similar approach to that described for **51a**. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.43–1.62 (2H, m), 1.68–1.87 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.17–2.70 (11H, m), 3.23–3.35 (2H, m), 3.74 (6H, s), 3.74 (3H, s), 5.07 (2H, s), 6.46 (1H, t, *J* = 2.4 Hz), 6.60 (2H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.78 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.23 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz), 7.32 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.29 (2H, s), 9.15 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 549; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₀H₄₁N₆O₄ [M+H]⁺: 549.3184. Found: 549.3179; *Anal.* Calcd for

C₃₀H₄₀N₆O₄·0.01IPE·0.03H₂O: C, 65.6; H, 7.4; N, 15.3. Found: C, 65.9; H, 7.4; N, 15.0.

2,4-Dichloro-3-ethynyl-1,5-dimethoxybenzene (53a)

To a mixture of 1-ethynyl-3,5-dimethoxybenzene (**52**, 500 mg, 3.08 mmol) in MeCN (10.0 mL) was added SO₂Cl₂ (524 μL, 6.47 mmol) in an ice-water bath under an argon atmosphere. After stirring at room temperature for 12 h, the mixture was concentrated *in vacuo* to give a residue, which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 98:2 to 60:40) to give the product (335 mg, 47%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.68 (1H, s), 3.92 (6H, s), 6.58 (1H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 231.

3-Ethynyl-2,4-difluoro-1,5-dimethoxybenzene (53b)

1-Ethynyl-2-fluoro-3,5-dimethoxybenzene (53c)

To a mixture of **52** (5.00 g, 30.8 mmol) in MeCN (100 mL) was added Selectfluor™ (24.3 g, 61.7 mmol) in an ice-water bath. The mixture was allowed to gradually warm to room temperature and stirred for 4 days. The mixture was quenched with NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 95:5 to 70:30) to give **53c** (1.74 g, 31%) as a pale yellow oil and crude material for **53b**, which was purified twice by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/CHCl₃ = 50:50 to 0:100) to give **53b** (1.21 g, 20%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.52 (1H, s), 3.88 (6H, s), 6.66 (1H, t, *J* = 8.0 Hz); MS (EI) *m/z* [M]⁺ 198 (for **53b**); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.29 (1H, s), 3.77 (3H, s), 3.86 (3H, s), 6.49 (1H, dd, *J* = 4.5, 2.9 Hz), 6.54 (1H, dd, *J* = 7.0, 2.9 Hz); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 181 (for **53c**).

2-Chloro-3-ethynyl-4-fluoro-1,5-dimethoxybenzene (53d)

Compound **53d** was prepared from **53c** in 83% yield using a similar approach to that described for **53a**. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 3.60 (1H, s), 3.89 (3H, s), 3.91 (3H, s), 6.61 (1H, d, *J* = 7.5 Hz); MS (CI) *m/z* [M]⁺ 214.

5-Iodo-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (55)

To a mixture of 2-chloro-5-iodopyrimidine (**54**, 1.00 g, 4.16 mmol) and **31** (1.27 g, 4.16 mmol) in IPA (20.0 mL) was added MsOH (809 μL, 12.5 mmol). After stirring at 130 °C for 3 h under μW irradiation, the mixture was quenched with NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on

silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give the crude product, which was purified again by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH = 100:0 to 80:20). EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (1.76 g, 83%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.74–1.98 (4H, m), 2.25–2.34 (3H, m), 2.36–2.72 (11H, m), 3.46–3.55 (2H, m), 3.85–3.89 (3H, m), 6.86–6.94 (1H, m), 6.94–7.01 (2H, m), 7.16–7.21 (1H, m), 8.49 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 509.

5-[(2,6-Dichloro-3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (56a)

To a mixture of **55** (200 mg, 0.393 mmol), **53a** (100 mg, 0.433 mmol), Pd(PPh₃)₄ (22.7 mg, 19.7 μ mol), CuI (3.75 mg, 19.7 μ mol) in DMF (4.00 mL) was added DIPEA (135 μ L, 0.787 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 80 °C for 1 h, the mixture was diluted with EtOAc and water and passed through a Celite pad. The organic layer was separated and washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give the product (126 mg, 52%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm 1.74–1.94 (4H, m), 2.30 (3H, s), 2.37–2.75 (11H, m), 3.47–3.56 (2H, m), 3.89 (3H, s), 3.94 (6H, s), 6.57 (1H, s), 6.91 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.99–7.05 (1H, m), 7.16 (1H, s), 7.31 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.60 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 611, 613.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (56b)

To a mixture of **55** (182 mg, 0.358 mmol), **53b** (85.1 mg, 0.430 mmol), Pd(PPh₃)₄ (41.4 mg, 35.8 μ mol), CuI (3.41 mg, 17.9 μ mol) in DMF (3.64 mL) was added Et₃N (123 μ L, 0.716 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 100 °C for 4 h, the mixture was diluted with EtOAc and passed through a Celite pad. The filtrate was diluted with NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give crude material, which was purified again by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH = 100:0 to 80:20). The residue was added EtOAc and stirred under heating condition. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (120 mg, 58%) as a yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.44–1.68 (2H, m), 1.71–1.91 (2H, m), 2.17–2.75 (14H, m), 3.24–3.41 (2H, m), 3.77 (3H, s), 3.90 (6H, s), 6.84 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.10 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.27 (1H, dd, *J* =

8.6, 2.4 Hz), 7.33 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.64 (2H, s), 9.91 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 579.

5-[(2-Fluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (56c)

Compound **56c** was prepared from **55** and **53c** in 55% yield using a similar approach to that described for **56a**. $^1\text{H NMR}$ (399 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.43–1.64 (2H, m), 1.71–1.88 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20–2.59 (11H, m), 3.26–3.39 (2H, m), 3.74–3.80 (6H, m), 3.85 (3H, s), 6.65 (1H, dd, $J = 4.7, 2.9$ Hz), 6.79 (1H, dd, $J = 7.0, 2.9$ Hz), 6.84 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.27 (1H, dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz), 7.32 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.62 (2H, s), 9.84 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 561.

5-[(2-Chloro-6-fluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (56d)

Compound **56d** was prepared from **55** and **53d** in 66% yield using a similar approach to that described for **56a**. $^1\text{H NMR}$ (399 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.46–1.62 (2H, m), 1.71–1.88 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20–2.58 (11H, m), 3.28–3.38 (2H, m), 3.77 (3H, s), 3.89–3.97 (6H, m), 6.84 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.26 (1H, dd, $J = 8.6, 2.2$ Hz), 7.35 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.64 (2H, s), 9.91 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 595.

5-[2-(2,6-Dichloro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (57a)

A mixture of **56a** (126 mg, 0.206 mmol) and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (1.92 g, 10.3 mmol) in DME (2.52 mL) was stirred at 110 °C. To the mixture was added a solution of NaOAc (845 mg, 10.3 mmol) in water (2.52 mL) over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, *p*-toluenesulfonyl hydrazide (1.92 g, 10.3 mmol) and NaOAc (845 mg, 10.3 mmol) were added over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, the mixture was neutralized with NaHCO_3 *aq.* and extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (1.92 g, 10.3 mmol) in DME (2.52 mL) was stirred at 110 °C. To the mixture was added a solution of NaOAc (845 mg, 10.3 mmol) in water (2.52 mL) over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, the mixture was neutralized with NaHCO_3 *aq.* and extracted with CHCl_3 . The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/28\% \text{NH}_3$ *aq.* = 100:0:0 to 80:18:2). EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered, washed with IPE, and dried to give the product (53.0 mg, 42%) as a pale yellow solid. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 1.46–1.60 (2H, m), 1.74–1.83 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20–2.56 (11H, m), 2.65–2.72 (2H, m), 3.08–3.17 (2H, m), 3.26–3.35

(2H, m), 3.75 (3H, s), 3.90 (6H, s), 6.79 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.83 (1H, s), 7.24 (1H, dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz), 7.37 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.23 (2H, s), 9.28 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 615, 617; HRMS (ESI) m/z Calcd for $C_{31}H_{41}Cl_2N_6O_3$ $[M+H]^+$: 615.2612. Found: 615.2608; *Anal.* Calcd for $C_{31}H_{40}Cl_2N_6O_3 \cdot 0.2EtOAc \cdot 0.2H_2O$: C, 59.98; H, 6.65; N, 13.20; Cl, 11.13. Found: C, 59.95; H, 6.52; N, 13.04; Cl, 11.27.

5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (57b)

A mixture of **56b** (7.50 g, 13.0 mmol) and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (24.2 g, 130 mmol) in DME (75.0 mL) was stirred at 110 °C. To the mixture was added a solution of NaOAc (10.6 g, 130 mmol) in water (15.0 mL) over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, *p*-toluenesulfonyl hydrazide (12.1 g, 64.8 mmol) and NaOAc (5.32 g, 64.8 mmol) were added over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, *p*-toluenesulfonyl hydrazide (12.1 g, 64.8 mmol) and NaOAc (5.32 g, 64.8 mmol) were added over 2 h. The mixture was stirred at 110 °C for 2 h. The mixture was neutralized with $NaHCO_3$ *aq.* and extracted with $CHCl_3$. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. A mixture of the residue and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (12.1 g, 64.8 mmol) in DME (75.0 mL) was stirred at 110 °C. To the mixture was added a solution of NaOAc (5.32 g, 64.8 mmol) in water (15.0 mL) over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, *p*-toluenesulfonyl hydrazide (12.1 g, 64.8 mmol) and NaOAc (5.32 g, 64.8 mmol) were added over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, the mixture was neutralized with $NaHCO_3$ *aq.* and extracted with $CHCl_3$. The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel ($CHCl_3/MeOH/28\% NH_3$ *aq.* = 100:0:0 to 80:18:2). EtOAc (140 mL) and EtOH (10 mL) were added to the residue, and the resulting precipitate was filtered to give the crude product. EtOH (50 mL) was added to the crude product, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (1.78 g, 24%) as a pale yellow solid. 1H NMR (399 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 1.46–1.59 (2H, m), 1.74–1.82 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.18–2.58 (11H, m), 2.65–2.75 (2H, m), 2.84–2.93 (2H, m), 3.24–3.38 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.81 (6H, s), 6.79 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 6.85 (1H, t, $J = 8.4$ Hz), 7.23 (1H, dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz), 7.34 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.17 (2H, s), 9.25 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 583; HRMS (ESI) m/z Calcd for $C_{31}H_{41}F_2N_6O_3$ $[M+H]^+$: 583.3203. Found: 583.3195; *Anal.* Calcd for $C_{31}H_{40}F_2N_6O_3 \cdot 0.1H_2O$: C, 63.7; H, 6.9; N, 14.4; F, 6.5. Found: C, 63.8; H, 7.1; N, 14.2; F, 6.1.

5-[2-(2-Fluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (57c)

A mixture of **56c** (122 mg, 0.218 mmol) and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (2.03 g, 10.9 mmol) in DME (2.44 mL) was stirred at 110 °C. To the mixture was added a solution of NaOAc (893 mg, 10.9 mmol) in water (1.22 mL) over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, *p*-toluenesulfonyl hydrazide (1.01 g, 5.45 mmol) and NaOAc (447 mg, 5.45 mmol) were added over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, the mixture was neutralized with NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 80:18:2). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (63.0 mg, 51%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.45–1.61 (2H, m), 1.73–1.83 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.19–2.56 (11H, m), 2.70–2.77 (2H, m), 2.79–2.87 (2H, m), 3.25–3.34 (2H, m), 3.70 (3H, s), 3.74 (3H, s), 3.78 (3H, s), 6.37 (1H, dd, *J* = 5.1, 2.9 Hz), 6.55 (1H, dd, *J* = 7.0, 2.9 Hz), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.24 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.23 (2H, s), 9.24 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 565; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₁H₄₂FN₆O₃ [M+H]⁺: 565.3297. Found: 565.3287; *Anal.* Calcd for C₃₁H₄₁FN₆O₃·0.4H₂O: C, 65.10; H, 7.37; N, 14.70; F, 3.32. Found: C, 65.18; H, 7.24; N, 14.55; F, 3.33.

5-[2-(2-Chloro-6-fluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (57d)

A mixture of **56d** (126 mg, 0.212 mmol) and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (1.97 g, 10.6 mmol) in DME (2.52 mL) was stirred at 110 °C. To the mixture was added a solution of NaOAc (870 mg, 10.6 mmol) in water (2.52 mL) over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, *p*-toluenesulfonyl hydrazide (1.97 g, 10.6 mmol) and NaOAc (870 mg, 10.6 mmol) were added over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, the mixture was neutralized with NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 80:18:2) to give crude material, which was purified again by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 80:18:2). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (88.0 mg, 69%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.47–1.61 (2H, m), 1.73–1.85 (2H, m), 2.17 (3H, s), 2.21–2.60 (11H, m), 2.65–2.75 (2H, m), 2.93–3.03 (2H, m), 3.24–3.39 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.84–3.88 (6H, m), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.84 (1H, d, *J* = 7.8 Hz), 7.23 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.18 (2H, s), 9.26 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 599; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for

$C_{31}H_{41}ClFN_6O_3$ $[M+H]^+$: 599.2907. Found: 599.2897; *Anal.* Calcd for $C_{31}H_{40}ClFN_6O_3 \cdot 0.4H_2O$: C, 61.41; H, 6.78; N, 13.86; Cl, 5.85; F, 3.13. Found: C, 61.39; H, 6.78; N, 13.70; Cl, 5.91; F, 3.10.

Chapter 3

5-Iodo-*N*-{3-methoxy-4-[4-(1-methylpiperidin-4-yl)piperazin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (59a)

To a mixture of 2-chloro-5-iodopyrimidine (**54**, 300 mg, 1.25 mmol) and 3-methoxy-4-[4-(1-methylpiperidin-4-yl)piperazin-1-yl]aniline (**58**⁴⁵), 380 mg, 1.25 mmol) in IPA (6.00 mL) was added MsOH (0.243 mL, 3.75 mmol). After stirring at 130 °C for 3 h under μ W irradiation, the mixture was quenched with $NaHCO_3$ *aq.* and extracted with $CHCl_3$. The organic layer was dried over Na_2SO_4 and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel ($CHCl_3/MeOH = 100:0$ to $80:20$) to give crude material, which was purified again by column chromatography on amino functionalized silica gel ($EtOAc/MeOH = 100:0$ to $80:20$) to give the product (357 mg, 56%) as a pale yellow solid. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm; 1.58–1.70 (2H, m), 1.79–1.89 (2H, m), 1.89–2.01 (2H, m), 2.24–2.35 (4H, m), 2.69–2.84 (4H, m), 2.87–2.98 (2H, m), 3.01–3.12 (4H, m), 3.87 (3H, s), 6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.96 (1H, br s), 7.00 (1H, dd, $J = 8.4, 2.4$ Hz), 7.20 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.49 (2H, s); MS (APCI/ESI) m/z $[M+H]^+$ 509.

5-Iodo-*N*-[3-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]pyrimidin-2-amine (59b)

Compound **59b** was prepared from **54** and 3-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)aniline (**2**) in 66% yield using a similar approach to that described for **59a**. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm; 2.36 (3H, s), 2.54–2.72 (4H, m), 2.99–3.16 (4H, m), 3.87 (3H, s), 6.91 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.98 (1H, s), 7.01 (1H, dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz), 7.20 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.49 (2H, s); MS (APCI/ESI) m/z $[M+H]^+$ 426.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(1-methylpiperidin-4-yl)piperazin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (60a)

To a mixture of **59a** (150 mg, 0.295 mmol), 3-ethynyl-2,4-difluoro-1,5-dimethoxybenzene (**53b**, 64.3 mg, 0.324 mmol), $Pd(PPh_3)_4$ (17.0 mg, 14.7 μ mol), and CuI (2.81 mg, 14.8 μ mol) in DMF (3.00 mL) was added DIPEA (101 μ L, 0.590 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 80 °C for 1 h, the mixture was diluted with $EtOAc$ and water. The insoluble material was removed by filtration and the filtrate was extracted with $EtOAc$. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by

column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20). EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (77.0 mg, 45%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.36–1.48 (2H, m), 1.69–1.78 (2H, m), 1.80–1.89 (2H, m), 2.09–2.18 (4H, m), 2.55–2.64 (4H, m), 2.74–2.83 (2H, m), 2.85–2.97 (4H, m), 3.76 (3H, s), 3.90 (6H, s), 6.83 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.10 (1H, t, *J* = 8.3 Hz), 7.27 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.2 Hz), 7.33 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.64 (2H, s), 9.91 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 579.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl]-*N*-[3-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]pyrimidin-2-amine (60b)

To a mixture of **59b** (500 mg, 1.18 mmol) and 3-ethynyl-2,4-difluoro-1,5-dimethoxybenzene (**53b**, 233 mg, 1.18 mmol) in DMF (10.0 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (67.9 mg, 58.8 μ mol), CuI (11.2 mg, 58.8 μ mol), and DIPEA (403 μ L, 2.35 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 80 °C for 1 h, the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give the crude material, which was purified again by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH = 100:0 to 80:20). To the residue was added NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20). EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (418 mg, 72%) as a yellow solid. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 2.21 (3H, s), 2.38–2.48 (4H, m), 2.83–3.01 (4H, m), 3.77 (3H, s), 3.90 (6H, s), 6.84 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.10 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.28 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.64 (2H, s), 9.91 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 496.

5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(1-methylpiperidin-4-yl)piperazin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (61a)

A mixture of **60a** (164 mg, 0.283 mmol) and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (2.64 g, 14.2 mmol) in DME (3.28 mL) was stirred at 110 °C under an argon atmosphere. To the mixture was added a solution of NaOAc (1.16 g, 14.1 mmol) in water (1.64 mL) over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, *p*-toluenesulfonyl hydrazide (1.32 g, 7.09 mmol) and NaOAc (581 mg, 7.08 mmol) were added to the reaction mixture over 2 h. After stirring at 110 °C for 2 h, the mixture was neutralized with NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 80:18:2). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (114 mg, 69%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (399

MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.36–1.48 (2H, m), 1.68–1.78 (2H, m), 1.79–1.88 (2H, m), 2.09–2.17 (4H, m), 2.53–2.64 (4H, m), 2.68–2.74 (2H, m), 2.75–2.82 (2H, m), 2.84–2.93 (6H, m), 3.74 (3H, s), 3.81 (6H, s), 6.78 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.85 (1H, t, *J* = 8.3 Hz), 7.24 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.18 (2H, s), 9.26 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 583; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₁H₄₁F₂N₆O₃ [M+H]⁺: 583.3203. Found: 583.3202; *Anal.* Calcd for C₃₁H₄₀F₂N₆O₃·0.1H₂O: C, 63.70; H, 6.93; N, 14.38; F, 6.50. Found: C, 63.76; H, 6.85; N, 14.29; F, 6.43.

5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-[3-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]pyrimidin-2-amine (61b)

A mixture of **60b** (328 mg, 0.662 mmol) and *p*-toluenesulfonyl hydrazide (2.46 g, 13.2 mmol) in DME (6.56 mL) was stirred at 110 °C under an argon atmosphere. To the mixture was added a solution of NaOAc (543 mg, 6.62 mmol) in water (3.28 mL) over 1 h. After stirring at 110 °C for 4 h, *p*-toluenesulfonyl hydrazide (1.23 g, 6.60 mmol) and NaOAc (543 mg, 6.62 mmol) were added to the reaction mixture. After stirring at 110 °C for 4 h, the mixture was neutralized with NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (256 mg, 77%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 2.21 (3H, s), 2.38–2.48 (4H, m), 2.68–2.74 (2H, m), 2.83–2.95 (6H, m), 3.74 (3H, s), 3.81 (6H, s), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 6.85 (1H, t, *J* = 8.3 Hz), 7.25 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.36 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.18 (2H, s), 9.26 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 500; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₆H₃₂F₂N₅O₃ [M+H]⁺: 500.2468. Found: 500.2466; *Anal.* Calcd for C₂₆H₃₁F₂N₅O₃·0.1H₂O: C, 62.3; H, 6.3; N, 14.0; F, 7.6. Found: C, 62.4; H, 6.4; N, 13.9; F, 7.6.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethynyl]pyrimidin-2-amine (63)

To a mixture of 5-iodopyrimidin-2-amine (**62**, 2.83 g, 12.8 mmol) and 3-ethynyl-2,4-difluoro-1,5-dimethoxybenzene (**53b**, 2.50 g, 12.6 mmol) in DMF (150 mL) were added Pd(PPh₃)₄ (729 mg, 0.631 mmol), CuI (120 mg, 0.630 mmol), and DIPEA (4.32 mL, 25.2 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 80 °C for 1 h, the mixture was concentrated *in vacuo* and diluted with CHCl₃ and water. The insoluble material was removed by filtration and the filtrate was extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give the product (1.80 g, 49%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 3.89 (6H, s), 7.08 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.27 (2H, s), 8.44 (2H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 292.

5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]pyrimidin-2-amine (64)

To a mixture of **63** (2.11 g, 7.25 mmol) in MeOH (14.1 mL) and THF (14.1 mL) was added 10% Pd/C (50% wet, 385 mg) under an argon atmosphere. After stirring at 60 °C under a hydrogen atmosphere (1.2 atm) for 6 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give the product (2.13 g, 99%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 2.70–2.76 (2H, m), 2.90–2.95 (2H, m), 3.85 (6H, s), 4.86 (2H, br s), 6.51 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 8.09 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 296.

5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]pyrimidin-2-ol (65)

To a mixture of **64** (3.27 g, 11.1 mmol) in AcOH (32.7 mL) was added NaNO₂ (1.53 g, 22.2 mmol) in water (16.3 mL) in an ice-water bath. After stirring at 70 °C for 3 h, NaOH (1.0 M aqueous solution) was added to the mixture at room temperature. The mixture was washed with EtOAc, acidified with citric acid *aq.*, and extracted with CHCl₃. The organic layer was dried over Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo* to give the product (3.61 g, quantitative yield) as a beige solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 2.70–2.77 (2H, m), 2.91–3.00 (2H, m), 3.85 (6H, s), 6.53 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 8.00 (2H, br s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 297.

2-Chloro-5-[2-(2,6-difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]pyrimidine (66)

To a mixture of **65** (55.0 mg, 0.186 mmol) in *N,N*-dimethylaniline (32.3 μL, 0.278 mmol) was added POCl₃ (1.00 mL, 10.9 mmol) in an ice-water bath. After stirring at 100 °C for 4 h, the mixture was poured into ice-water. The resulting precipitate was collected by filtration and dried to give the product (43.0 mg, 74%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 2.87–2.94 (2H, m), 2.98–3.05 (2H, m), 3.85 (6H, s), 6.52 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 8.38 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 315.

5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-[4-(1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl)-3-methoxyphenyl]pyrimidin-2-amine (67)

To a mixture of **66** (300 mg, 0.953 mmol), 4-(1,4-dioxo-8-azaspiro[4.5]decan-8-yl)-3-methoxyaniline (**21**, 270 mg, 1.02 mmol), Pd(OAc)₂ (30.0 mg, 0.134 mmol), and *rac*-BINAP (160 mg, 0.257 mmol) in 1,4-dioxane (6.00 mL) was added Cs₂CO₃ (500 mg, 1.54 mmol). After stirring at 100 °C for 4 h under an argon atmosphere, the mixture was quenched with NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc twice. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 80:20 to 0:100) to give the product (346 mg, 67%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 1.92 (4H, t, *J* = 5.6 Hz),

2.76 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 2.95 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 3.04–3.15 (4H, m), 3.85 (6H, s), 3.89 (3H, s), 4.00 (4H, s), 6.51 (1H, t, $J = 8.1$ Hz), 6.89 (1H, s), 6.93 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.01 (1H, dd, $J = 8.6, 2.3$ Hz), 7.25–7.28 (1H, m), 8.19 (2H, s); MS (APCI/ESI) m/z $[M+H]^+$ 543.

1-[4-({5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]pyrimidin-2-yl}amino)-2-methoxyphenyl]piperidin-4-one (68)

To a mixture of **67** (346 mg, 0.638 mmol) in AcOH (4.00 mL) and water (4.00 mL) was added *conc.* HCl (12.0 M aqueous solution, 0.266 mL, 3.19 mmol). After stirring at 80 °C for 12 h, the mixture was neutralized with NaOH (1.0 M aqueous solution) and sat. NaHCO₃ *aq.* The resulting precipitate was corrected by filtration and dried to give the product (493 mg, quantitative yield) as a beige solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 2.63 (4H, t, $J = 6.0$ Hz), 2.77 (2H, t, $J = 7.6$ Hz), 2.96 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 3.33 (4H, t, $J = 6.0$ Hz), 3.85 (6H, s), 3.93 (3H, s), 6.51 (1H, t, $J = 8.0$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.98 (1H, s), 7.03 (1H, dd, $J = 8.6, 2.4$ Hz), 7.34 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.21 (2H, s); MS (APCI/ESI) m/z $[M+H]^+$ 499.

5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-(3-methoxy-4-{4-[(1-methylpiperidin-4-yl)amino]piperidin-1-yl}phenyl)pyrimidin-2-amine (69)

To a mixture of **68** (493 mg, 0.989 mmol) and 1-methylpiperidin-4-amine (169 mg, 1.48 mmol) in DCE (9.86 mL) was added NaBH(OAc)₃ (419 mg, 1.98 mmol). After stirring at room temperature for 12 h, the mixture was quenched with NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 80:18:2). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (133 mg, 23%) as a colorless solid. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.16–1.39 (5H, m), 1.67–1.77 (2H, m), 1.78–1.90 (4H, m), 2.12 (3H, s), 2.45–2.55 (3H, m), 2.55–2.63 (1H, m), 2.64–2.74 (4H, m), 2.84–2.93 (2H, m), 3.16–3.26 (2H, m), 3.74 (3H, s), 3.81 (6H, s), 6.79 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 6.85 (1H, t, $J = 8.4$ Hz), 7.23 (1H, dd, $J = 8.7, 2.3$ Hz), 7.34 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 8.17 (2H, s), 9.24 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 597.

5-[2-(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)ethyl]-*N*-(3-methoxy-4-{4-[methyl(1-methylpiperidin-4-yl)amino]piperidin-1-yl}phenyl)pyrimidin-2-amine tetrahydrochloride (70)

To a mixture of **69** (114 mg, 0.191 mmol) and 1-*H*-benzotriazol-1-methanol (34.2 mg, 0.229 mmol) in CH₂Cl₂ (3.00 mL) and MeOH (1.50 mL) was added NaBH(OAc)₃ (81.0 mg, 0.382 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was quenched with water and sat. NaHCO₃ *aq.* and extracted with CHCl₃. The

organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20). HCl (4.0 M EtOAc solution, 2.00 mL, 8.00 mmol) was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (125 mg, 87%) as a colorless solid. ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ ppm; 2.15–2.33 (2H, m), 2.41–2.68 (6H, m), 2.83–2.90 (2H, m), 2.93 (6H, s), 2.95–3.06 (3H, m), 3.19–3.29 (2H, m), 3.69–3.77 (2H, m), 3.79–3.89 (2H, m), 3.83 (6H, s), 3.89–4.00 (3H, m), 4.02–4.16 (1H, m), 4.06 (3H, s), 6.75 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 7.39 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.3 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 7.82 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 8.31 (2H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 611; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₃H₄₅F₂N₆O₃ [M+H]⁺: 611.3516. Found: 611.3516; *Anal.* Calcd for C₃₃H₄₄F₂N₆O₃·3.8HCl·4.5H₂O: C, 47.73; H, 6.90; N, 10.12; Cl, 16.22; F, 4.58. Found: C, 47.77; H, 6.98; N, 10.01; Cl, 16.14; F, 4.63.

(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methyl methanesulfonate (72)

To a mixture of (2,6-difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methanol (**71**, 29.8 g, 146 mmol) and Et₃N (30.5 mL, 219 mmol) in THF (150 mL) was added methanesulfonyl chloride (13.6 mL, 175 mmol) in THF (30.0 mL) in an ice-water bath. After stirring in an ice-water bath for 1.5 h, the insoluble material was removed by filtration and washed with EtOAc. The filtrate was diluted with sat. NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to give the product (41.0 g, 100%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 3.04 (3H, s), 3.89 (6H, s), 5.34 (2H, s), 6.72 (1H, t, *J* = 8.1 Hz); MS (ESI) *m/z* [M+Na]⁺ 305.

2-Chloro-5-[(2,6-difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]pyrimidine (73)

To a mixture of **72** (7.89 g, 28.0 mmol) and 2-chloropyrimidin-5-ol (4.38 g, 33.6 mmol) in DMF (78.9 mL) was added K₂CO₃ (9.27 g, 67.1 mmol). After stirring at 60 °C for 1 h, the mixture was quenched with water and stirred for 30 min in an ice-water bath. The resulting precipitate was corrected by filtration, washed with water, and dried to give the product (8.53 g, 96%) as a beige solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 3.88 (6H, s), 5.30–5.35 (2H, m), 7.11 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 8.64 (2H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 317.

1-[1-(3-Methoxy-5-nitropyridin-2-yl)piperidin-4-yl]-4-methylpiperazine (76a)

To a mixture of 2-chloro-3-methoxy-5-nitropyridine (**74**, 377 mg, 2.00 mmol) and DIPEA (510 μ L, 2.98 mmol) in 1,4-dioxane (10.0 mL) was added 1-methyl-4-(piperidin-4-yl)piperazine (**75**, 403 mg, 2.20 mmol). After stirring at 80 °C for 6 h, the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue

was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 98:2 to 90:10) to give the product (500 mg, 75%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 1.54–1.68 (2H, m), 1.90–2.00 (2H, m), 2.25–2.34 (3H, m), 2.34–2.74 (9H, m), 2.89–3.01 (2H, m), 3.88–3.93 (3H, m), 4.59–4.67 (2H, m), 7.65–7.69 (1H, m), 8.71–8.76 (1H, m); MS (APCI/ESI) m/z [M+H]⁺ 336.

2-[4-(4-Methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]-5-nitropyrimidine (76b)

To a mixture of 2-chloro-5-nitropyrimidine (**41c**, 798 mg, 5.00 mmol) and K₂CO₃ (1.04 g, 7.52 mmol) in DMF (16.0 mL) was added **75** (1.10 g, 6.00 mmol). After stirring at room temperature for 3 h, the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 95:5) to give the product (542 mg, 35%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 1.46–1.60 (2H, m), 1.95–2.04 (2H, m), 2.29 (3H, s), 2.36–2.77 (9H, m), 3.01–3.13 (2H, m), 4.90–5.00 (2H, m), 9.03–9.06 (2H, m); MS (ESI) m/z [M+H]⁺ 307.

5-Methoxy-6-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]pyridin-3-amine (77d)

To a mixture of **76a** (318 mg, 0.948 mmol) in EtOH (18.9 mL) was added 10% Pd/C (30 mg). After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 16 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give the product (289 mg, 100%) as a solid. MS (APCI/ESI) m/z [M+H]⁺ 306.

2-[4-(4-Methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]pyrimidin-5-amine (77f)

To a mixture of **76b** (530 mg, 1.73 mmol) in EtOH (20.0 mL) was added 10% Pd/C (105 mg). After stirring at room temperature under a hydrogen atmosphere (1.0 atm) for 4 h, the mixture was passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 50:50 to 0:100) to give the product (451 mg, 94%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ ppm; 1.42–1.56 (2H, m), 1.86–2.05 (2H, m), 2.25–2.32 (3H, m), 2.37–2.74 (9H, m), 2.76–2.88 (2H, m), 3.13 (2H, br s), 4.57–4.67 (2H, m), 7.95–7.99 (2H, m); MS (APCI/ESI) m/z [M+H]⁺ 277.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (78a)

To a mixture of **73** (3.15 g, 9.95 mmol), 3-methoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]aniline (**31**, 3.94 g, 12.9 mmol), *rac*-BINAP (929 mg, 1.49 mmol), and Cs₂CO₃ (9.72 g, 29.8 mmol) in 1,4-dioxane (63.0 mL) was added Pd(OAc)₂

(223 mg, 0.993 mmol) under an argon atmosphere. After stirring at 100 °C overnight, the mixture was diluted with EtOAc and HCl (1.0 M aqueous solution). The insoluble material was removed by filtration and the filtrate was extracted with HCl (1.0 M aqueous solution). The organic layer was extracted again with HCl (1.0 M aqueous solution). The combined aqueous layer was washed with EtOAc and basified with NaOH (1.0 M aqueous solution). The resulting precipitate was collected by filtration, washed with water, and dried. The crude material was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc). To the residue was added EtOH and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (4.42 g, 76%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.46–1.60 (2H, m), 1.74–1.83 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.19–2.55 (11H, m), 3.25–3.35 (2H, m), 3.75 (3H, s), 3.87 (6H, s), 5.16 (2H, s), 6.79 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.07 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.23 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.32 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.29 (2H, s), 9.21 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 585; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₀H₃₉F₂N₆O₄ [M+H]⁺: 585.2995. Found: 585.2992; *Anal.* Calcd for C₃₀H₃₈F₂N₆O₄·0.1H₂O: C, 61.44; H, 6.57; N, 14.33; F, 6.48. Found: C, 61.43; H, 6.55; N, 14.18; F, 6.44.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-[3-methoxy-4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl]pyrimidin-2-amine (78b)

To a mixture of **73** (444 mg, 1.40 mmol), **2** (403 mg, 1.82 mmol), *rac*-BINAP (288 mg, 0.463 mmol), and Cs₂CO₃ (1.37 g, 4.20 mmol) in 1,4-dioxane (8.88 mL) was added Pd(OAc)₂ (63.0 mg, 0.281 mmol). After stirring at 100 °C for 5 h under an argon atmosphere, the mixture was quenched with water and extracted with EtOAc thrice. The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 90:9:1) to give crude material, which was purified again by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc). To the residue was added EtOAc and the mixture was stirred under heating condition. After cooling to room temperature, the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (336 mg, 48%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 2.21 (3H, s), 2.36–2.48 (4H, m), 2.81–2.97 (4H, m), 3.75 (3H, s), 3.87 (6H, s), 5.16 (2H, s), 6.79 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.07 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.25 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.34 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.30 (2H, s), 9.23 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 502; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₅H₃₀F₂N₅O₄ [M+H]⁺: 502.2260. Found: 502.2255; *Anal.* Calcd for C₂₅H₂₉F₂N₅O₄·0.1H₂O: C, 59.66; H, 5.85; N, 13.91; F, 7.55. Found: C, 59.75; H, 5.87; N, 13.87; F, 7.54.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{3-methyl-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (78c)

To a mixture of **73** (200 mg, 0.632 mmol), 3-methyl-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]aniline (**77a**⁴⁵), 237 mg, 0.822 mmol), *rac*-BINAP (118 mg, 0.190 mmol), and Cs₂CO₃ (617 mg, 1.89 mmol) in 1,4-dioxane (4.00 mL) was added Pd(OAc)₂ (28.4 mg, 0.126 mmol). After stirring at 100 °C for 4 h under an argon atmosphere, the mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 90:9:1). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (227 mg, 63%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.47–1.61 (2H, m), 1.77–1.87 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.20 (3H, s), 2.21–2.40 (9H, m), 2.43–2.61 (2H, m), 2.94–3.06 (2H, m), 3.87 (6H, s), 5.16 (2H, s), 6.92 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.07 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.41–7.48 (2H, m), 8.28 (2H, s), 9.19 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 569; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₀H₃₉F₂N₆O₃ [M+H]⁺: 569.3046. Found: 569.3043; *Anal.* Calcd for C₃₀H₃₈F₂N₆O₃: C, 63.36; H, 6.74; N, 14.78; F, 6.68. Found: C, 63.51; H, 6.83; N, 14.71; F, 6.66.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{3-fluoro-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (78d)

To a mixture of **73** (155 mg, 0.489 mmol), 3-fluoro-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]aniline (**77b**⁶⁴), 186 mg, 0.636 mmol), *rac*-BINAP (91.4 mg, 0.147 mmol), and Cs₂CO₃ (478 mg, 1.47 mmol) in 1,4-dioxane (3.10 mL) was added Pd(OAc)₂ (22.0 mg, 98.0 μmol). After stirring at 100 °C for 4 h under an argon atmosphere, the mixture was quenched with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine and extracted with HCl (1.0 M aqueous solution) twice. The combined aqueous layer was washed with EtOAc, basified with NaOH (1.0 M aqueous solution) and sat. NaHCO₃ *aq.*, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (116 mg, 41%) as a colorless solid. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.47–1.62 (2H, m), 1.76–1.88 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.18–2.70 (11H, m), 3.23–3.34 (2H, m), 3.87 (6H, s), 5.17 (2H, s), 6.95 (1H, dd, *J* = 10.0, 9.0 Hz), 7.07 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.32 (1H, dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz), 7.64 (1H, dd, *J* = 15.4, 2.5 Hz), 8.33 (2H, s), 9.46 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 573; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₂₉H₃₆F₃N₆O₃ [M+H]⁺: 573.2796. Found: 573.2790; *Anal.* Calcd for C₂₉H₃₅F₃N₆O₃.0.1H₂O: C, 60.64; H, 6.18; N, 14.63; F, 9.92. Found: C, 60.70; H, 6.15; N, 14.49; F, 9.97.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{3-ethoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]phenyl}pyrimidin-2-amine (78e)

To a mixture of **73** (100 mg, 0.316 mmol), 3-ethoxy-4-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]aniline (**77c**⁴⁵), 151 mg, 0.474 mmol), *rac*-BINAP (59.0 mg, 94.8 μ mol), and Pd(OAc)₂ (14.2 mg, 63.2 μ mol) in 1,4-dioxane (4.00 mL) was added Cs₂CO₃ (206 mg, 0.632 mmol). After stirring at 100 °C for 4 h under an argon atmosphere, the mixture was diluted with EtOAc. The mixture was extracted with HCl (1.0 M aqueous solution) twice. The combined aqueous layer was neutralized with NaOH (1.0 M aqueous solution) and sat. NaHCO₃ aq., and extracted with EtOAc twice. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 80:20) to give crude material, which was purified again by column chromatography on amino functionalized silica gel (EtOAc). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (99 mg, 52%) as a colorless solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.35 (3H, t, *J* = 6.9 Hz), 1.46–1.58 (2H, m), 1.76–1.85 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.17–2.60 (11H, m), 3.28–3.37 (2H, m), 3.87 (6H, s), 3.98 (2H, q, *J* = 6.9 Hz), 5.16 (2H, s), 6.77 (1H, d, *J* = 8.6 Hz), 7.07 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.21 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 7.31 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 8.29 (2H, s), 9.19 (1H, s); MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 599; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₃₁H₄₁F₂N₆O₄ [M+H]⁺: 599.3152. Found: 599.3150; *Anal.* Calcd for C₃₁H₄₀F₂N₆O₄.2.2H₂O: C, 58.33; H, 7.01; N, 13.17; F, 5.95. Found: C, 58.07; H, 7.30; N, 13.07; F, 6.26.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{5-methoxy-6-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]pyridin-3-yl}pyrimidin-2-amine (78f)

To a mixture of **73** (200 mg, 0.632 mmol), **77d** (289 mg, 0.946 mmol), *rac*-BINAP (118 mg, 0.190 mmol), and Cs₂CO₃ (617 mg, 1.89 mmol) in 1,4-dioxane (13.3 mL) was added Pd(OAc)₂ (28.4 mg, 0.126 mmol). After stirring at 100 °C for 6 h under an argon atmosphere, the mixture was diluted with EtOAc. The mixture was extracted with HCl (1.0 M aqueous solution) twice. The combined aqueous layer was neutralized with NaOH (1.0 M aqueous solution) and extracted with CHCl₃. The organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 98:2 to 85:15). EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (26 mg, 7.0%) as a pale yellow solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.44–1.55 (2H, m), 1.74–1.82 (2H, m), 2.14 (3H, s), 2.19–2.70 (11H, m), 3.74–3.80 (5H, m), 3.87 (6H, s), 5.17 (2H, s), 7.07 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 8.13 (1H, d, *J* = 2.2 Hz),

8.31 (2H, s), 9.27 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 586; HRMS (ESI) m/z Calcd for $C_{29}H_{38}F_2N_7O_4$ $[M+H]^+$: 586.2948. Found: 586.2943.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{6-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]pyridin-3-yl}pyrimidin-2-amine (78g)

To a mixture of **73** (400 mg, 1.26 mmol), 6-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]pyridin-3-amine (**77e**⁴⁵), 522 mg, 1.90 mmol), *rac*-BINAP (236 mg, 0.379 mmol), and Cs_2CO_3 (1.23 g, 3.78 mmol) in 1,4-dioxane was added $Pd(OAc)_2$ (56.7 mg, 0.253 mmol). After stirring at 100 °C for 8 h under an argon atmosphere, the mixture was diluted with EtOAc. The mixture was extracted with HCl (1.0 M aqueous solution) twice. The combined aqueous layer was neutralized with NaOH (1.0 M aqueous solution) and extracted with $CHCl_3$. The organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on amino functionalized silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 40:60 to 0:100). EtOAc was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (442 mg, 63%) as a colorless solid. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.32–1.44 (2H, m), 1.75–1.84 (2H, m), 2.13 (3H, s), 2.22–2.56 (9H, m), 2.64–2.76 (2H, m), 3.87 (6H, s), 4.12–4.23 (2H, m), 5.15 (2H, s), 6.79 (1H, d, $J = 9.0$ Hz), 7.07 (1H, t, $J = 8.4$ Hz), 7.80 (1H, dd, $J = 9.1, 2.8$ Hz), 8.25 (2H, s), 8.34 (1H, d, $J = 2.7$ Hz), 9.11 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 556; HRMS (ESI) m/z Calcd for $C_{28}H_{36}F_2N_7O_3$ $[M+H]^+$: 556.2842. Found: 556.2839; *Anal.* Calcd for $C_{28}H_{35}F_2N_7O_3 \cdot 0.1H_2O$: C, 60.33; H, 6.37; N, 17.59; F, 6.82. Found: C, 60.42; H, 6.38; N, 17.54; Cl, 0.20; F, 6.92.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{2-[4-(4-methylpiperazin-1-yl)piperidin-1-yl]pyrimidin-5-yl}pyrimidin-2-amine (78h)

Compound **78h** was prepared from **73** and **77f** in 38% yield using a similar approach to that described for **78g**. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.25–1.38 (2H, m), 1.75–1.83 (2H, m), 2.13 (3H, s), 2.19–2.56 (9H, m), 2.78–2.88 (2H, m), 3.87 (6H, s), 4.52–4.62 (2H, m), 5.15 (2H, s), 7.07 (1H, t, $J = 8.4$ Hz), 8.26 (2H, s), 8.56 (2H, s), 9.09 (1H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 557; HRMS (ESI) m/z Calcd for $C_{27}H_{35}F_2N_8O_3$ $[M+H]^+$: 557.2795. Found: 557.2790; *Anal.* Calcd for $C_{27}H_{34}F_2N_8O_3 \cdot 0.1H_2O$: C, 58.07; H, 6.17; N, 20.07; F, 6.80. Found: C, 58.16; H, 6.17; N, 19.97; F, 6.90.

2-[4-({5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]pyrimidin-2-yl}amino)-1*H*-pyrazol-1-yl]ethan-1-ol (80)

A mixture of **73** (15.8 g, 50.0 mmol), 2-(4-amino-1*H*-pyrazol-1-yl)ethan-1-ol (**79**, 8.26 g, 65.0 mmol), $Pd(OAc)_2$ (561 mg, 2.50 mmol), *rac*-BINAP (2.34 g, 3.76 mmol), and Cs_2CO_3 (48.9 g, 150 mmol) in 1,4-dioxane (230 mL) was stirred at

100 °C for 30 h under an argon atmosphere. The mixture was diluted with CHCl₃ and IPA (3:1) and passed through a Celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo* and the residue was dissolved in CHCl₃ and IPA (3:1). The mixture was washed with water and brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH = 100:0 to 90:10). To the residue was added EtOH and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (11.2 g, 55%) as a pale orange solid. ¹H NMR (399 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 3.67–3.73 (2H, m), 3.87 (6H, s), 4.04–4.11 (2H, m), 4.84 (1H, t, *J* = 5.3 Hz), 5.14 (2H, s), 7.06 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.45 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 7.88 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 8.26 (2H, s), 9.21 (1H, s); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 39.04, 39.21, 39.37, 39.54, 53.60, 56.26, 59.74, 59.81, 100.98, 112.38 (t, *J* = 17.7 Hz), 119.06, 122.78, 129.03, 142.72 (dd, *J* = 10.7, 3.7 Hz), 142.82 (dd, *J* = 241.4, 6.0 Hz), 144.57, 146.36, 155.03; MS (ESI) *m/z* [M+H]⁺ 408; HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C₁₈H₂₀F₂N₅O₄ [M+H]⁺: 408.1478. Found: 408.1472; *Anal.* Calcd for C₁₈H₁₉F₂N₅O₄: C, 53.07; H, 4.70; N, 17.19; F, 9.33. Found: C, 53.11; H, 4.74; N, 17.21; F, 9.41; mp 149–151 °C.

2-[4-({5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]pyrimidin-2-yl}amino)-1H-pyrazol-1-yl]ethyl methanesulfonate (81)

To a mixture of **80** (450 mg, 1.10 mmol) in THF (18.0 mL) were added Et₃N (0.308 mL, 2.21 mmol) and methanesulfonyl chloride (129 μL, 1.66 mmol) in an ice-water bath. After stirring in an ice-water bath for 4 h, the insoluble material was removed by filtration. The filtrate was diluted with water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo* to give the product (408 mg, 76%) as a solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 3.06 (3H, s), 3.87 (6H, s), 4.36–4.44 (2H, m), 4.49–4.56 (2H, m), 5.15 (2H, s), 7.07 (1H, t, *J* = 8.4 Hz), 7.52 (1H, s), 7.95 (1H, s), 8.26 (2H, s), 9.26 (1H, s); MS (APCI/ESI) *m/z* [M+H]⁺ 486.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-(1-{2-[(1-methylpiperidin-4-yl)amino]ethyl}-1H-pyrazol-4-yl)pyrimidin-2-amine trihydrochloride (82)

To a mixture of **81** (500 mg, 1.03 mmol) in NMP (10.0 mL) was added 1-methylpiperidin-4-amine (1.25 g, 10.9 mmol). After stirring at 80 °C overnight, the mixture was quenched with water and sat. NaHCO₃ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel (CHCl₃/MeOH/28% NH₃ *aq.* = 100:0:0 to 90:9:1). To the residue was added HCl (4.0 M EtOAc solution), and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (130 mg, 21%) as a solid. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm; 1.93–2.05 (2H, m), 2.19–2.30 (2H, m), 2.65–2.77 (3H, m), 2.87–3.02 (2H, m),

3.20–3.57 (6H, m), 3.87 (6H, s), 4.40–4.47 (2H, m), 5.15 (2H, s), 7.07 (1H, t, $J = 8.5$ Hz), 7.55 (1H, d, $J = 0.8$ Hz), 7.97–8.00 (1H, m), 8.28 (2H, s), 9.35 (1H, s), 9.42–9.74 (2H, m), 10.66–10.97 (1H, m); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 504; HRMS (ESI) m/z Calcd for $C_{24}H_{32}F_2N_7O_3$ $[M+H]^+$: 504.2529. Found: 504.2525; *Anal.* Calcd for $C_{24}H_{31}F_2N_7O_3 \cdot 3.3HCl \cdot 0.8AcOH \cdot 2.8H_2O$: C, 42.57; H, 6.01; N, 13.57; Cl, 16.20; F, 5.26. Found: C, 42.77; H, 6.14; N, 13.36; Cl, 16.38; F, 4.88.

***tert*-Butyl 4-{2-[4-({5-[(2,6-difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]pyrimidin-2-yl}amino)-1*H*-pyrazol-1-yl]ethyl}piperazine-1-carboxylate (83)**

To a mixture of **81** (320 mg, 0.659 mmol) in NMP (6.40 mL) was added 1-(*tert*-butoxycarbonyl)piperazine (1.31 g, 7.03 mmol). After stirring at 80 °C overnight and then 120 °C overnight, the mixture was quenched with water and sat. $NaHCO_3$ *aq.* and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over $MgSO_4$, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by column chromatography on silica gel ($CHCl_3/MeOH = 100:0$ to 90:10). EtOAc/IPE was added to the residue, and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (202 mg, 53%) as a colorless solid. 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm; 1.45 (9H, s), 2.32–2.48 (4H, m), 2.84 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.35–3.50 (4H, m), 3.88 (6H, s), 4.22 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 5.13 (2H, s), 6.68 (1H, t, $J = 8.1$ Hz), 7.46 (1H, s), 7.50 (1H, s), 7.91 (1H, s), 8.20 (2H, s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 576.

5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy]-*N*-{1-[2-(piperazin-1-yl)ethyl]-1*H*-pyrazol-4-yl}pyrimidin-2-amine trihydrochloride (84)

A mixture of **83** (202 mg, 0.351 mmol) in TFA was stirred at room temperature for 15 h. The mixture was concentrated *in vacuo*, neutralized with NaOH (1.0 M aqueous solution), and extracted with $CHCl_3$ and IPA (3:1). The organic layer was dried over $MgSO_4$ and concentrated *in vacuo*. To the residue was added HCl (4.0 M EtOAc solution), and the resulting precipitate was filtered and dried to give the product (133 mg, 65%) as a solid. 1H NMR (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm; 3.32–3.49 (8H, m), 3.52–3.61 (2H, m), 3.87 (6H, s), 4.55 (2H, t, $J = 6.6$ Hz), 5.16 (2H, s), 7.07 (1H, t, $J = 8.4$ Hz), 7.54 (1H, d, $J = 0.8$ Hz), 8.01 (1H, d, $J = 0.6$ Hz), 8.28 (2H, s), 9.36 (1H, s), 9.52 (2H, br s); MS (ESI) m/z $[M+H]^+$ 476; HRMS (ESI) m/z Calcd for $C_{22}H_{28}F_2N_7O_3$ $[M+H]^+$: 476.2216. Found: 476.2212; *Anal.* Calcd for $C_{22}H_{27}F_2N_7O_3 \cdot 3.3HCl \cdot 0.8AcOH \cdot 3.2H_2O$: C, 40.41; H, 5.73; N, 13.98; Cl, 16.68; F, 5.42. Found: C, 40.71; H, 5.52; N, 13.61; Cl, 16.88; F, 5.42.

5-Methoxy(6- ^{14}C)pyrimidine-2,4-diol (86)

To a suspension of sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 686 mg, 17.2 mmol) in toluene (8.5 mL) were added methyl methoxyacetate (1.68 mL, 17.0 mmol) and ethyl (^{14}C)formate (**85**, 37.0 GBq, 17.0 mmol) at 0 °C. The mixture was

stirred at room temperature overnight and concentrated. To the residue were added ethanol (8.5 mL) and urea (1.04 g, 17.3 mmol) and the mixture was stirred at 90 °C for 1.5 h. After cooled to room temperature, the mixture was concentrated and diluted with water (17 mL) and hydrochloric acid (6.0 mol/L solution in water, 2.83 mL). The resulting solid was filtered, washed with water (4.5 mL × 2), and dried over P₂O₅ *in vacuo* to give **86** (783 mg, 5.51 mmol).

2,4-Dichloro-5-methoxy(6-¹⁴C)pyrimidine (87)

A mixture of *N,N*-dimethylaniline (977 μL, 7.71 mmol) and **86** (783 mg, 5.51 mmol) in phosphorus(V) oxychloride (16.0 mL) was stirred at 130 °C overnight. After cooled to room temperature, the mixture was concentrated and diluted with ethyl acetate (15 mL) and water (15 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (15 mL × 3) and concentrated. The residue was purified by column chromatography [Silica gel, *n*-hexane/ethyl acetate = 3/1 (v/v)] to give **87** (4.82 GBq, 391 mg, 2.18 mmol).

2-Chloro-5-methoxy(4-¹⁴C)pyrimidine (88)

A mixture of **87** (4.82 GBq, 391 mg, 2.18 mmol) and zinc (dust, 292 mg, 4.47 mmol) in ethanol (2.5 mL) and water (2.5 mL) was stirred at 80 °C for 5 h. The hot mixture was filtered through the celite, washed with ethanol (2.5 mL). The filtrate was concentrated and purified by column chromatography [Silica gel, *n*-hexane/ethyl acetate = 3/1 (v/v)] to give **88** (2.73 GBq, 199 mg, 1.38 mmol).

2-Chloro(4-¹⁴C)pyrimidin-5-ol ([¹⁴C]49c)

To a solution of **88** (2.73 GBq, 199 mg, 1.38 mmol) in dichloromethane (1.75 mL) was added boron tribromide (1.0 mol/L solution in dichloromethane, 2.07 mL, 2.07 mmol) at 0 °C and the mixture was stirred at room temperature for 2 days. The mixture was diluted with methanol (3.0 mL) and concentrated. The residue was adjusted pH to 5 with sodium hydroxide (1.0 mol/L solution in water) and the mixture was diluted with water (10 mL) and ethyl acetate (10 mL). The mixture was extracted with ethyl acetate (10 mL × 3) and concentrated. The residue was purified by column chromatography [Silica gel, *n*-hexane/ethyl acetate = 3/1 → 1/1 (v/v)] to give [¹⁴C]**49c** (1.58 GBq, 95.1 mg, 729 μmol).

2-Chloro-5-[(2,6-difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy](4-¹⁴C)pyrimidine ([¹⁴C]73)

To a mixture of [¹⁴C]**49c** (1.58 GBq, 95.1 mg, 729 μmol) and **72** (233 mg, 825 μmol) in *N,N*-dimethylformamide (2.5 mL) was added cesium carbonate (483 mg, 1.48 mmol) at room temperature and the mixture was stirred at same temperature for 30 min. After diluted with water (5.0 mL), the mixture was stirred at room

temperature for 1 h. The resulting solid was filtered, washed with water (4.0 mL × 3), and dried over P₂O₅ *in vacuo* to give [¹⁴C]**73** (1.44 GBq, 211 mg, 666 μmol).

2-[4-({5-[(2,6-Difluoro-3,5-dimethoxyphenyl)methoxy](4-¹⁴C)pyrimidin-2-yl}amino)-1H-pyrazol-1-yl]ethan-1-ol ([¹⁴C]**80**)

To a mixture of [¹⁴C]**73** (1.44 GBq, 211 mg, 666 μmol) and [¹⁴C]**73** (228 mg, 720 μmol) in 1,4-dioxane (8.0 mL) were added potassium carbonate (590 mg, 4.27 mmol) and racemic BINAP (156 mg, 251 μmol) at room temperature under an argon atmosphere. The mixture was warmed to 80 °C, then a solution of **79** and a slurry of palladium (II) acetate (72.9 mg, 325 μmol) in 1,4-dioxane (2.0 mL) were added and the mixture was stirred at 90 °C overnight under an argon atmosphere. After cooled to room temperature, the mixture was diluted with ammonium hydroxide (25% solution in water, 7.5 mL) and water (9.0 mL). The mixture was stirred at room temperature for 1 h and diluted with water (14 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. The resulting solid was filtered and washed with water (5.0 mL) to give a crude solid. The filtrate was extracted with chloroform (10 mL × 3) and concentrated to give a crude solid. The combined crude solid was purified by column chromatography [Silica gel, chloroform/methanol = 9/1 (v/v), twice] and concentrated to give a solid. This solid was dissolved in chloroform (30 mL), passed through a membrane filter (GHP Acrodisc PSF, 0.45 μm), and concentrated to give [¹⁴C]**80** (1.29 GBq, 526 mg, 1.29 mmol). The obtained compound was recrystallized as follows. [¹⁴C]**80** (1.29 GBq, 526 mg, 1.29 mmol) was suspended in 2-propanol (10 mL), warmed to 90 °C to make a solution, cooled to 70 °C gradually, and stirred at 70 °C for 1 h. The resulting suspension was cooled to room temperature gradually, stirred at room temperature overnight, filtered, washed with 2-propanol (2.5 mL × 2), and dried over P₂O₅ *in vacuo* to give [¹⁴C]**80** (1.19 GBq, 425 mg, 1.04 mmol).

Crystallographic analysis

FGFR2 and FGFR3 proteins were crystallized by the sitting drop vapor diffusion method. FGFR2 cocrystals were obtained by co-crystallization with each compound, whereas FGFR3 cocrystals were obtained by soaking each compound into the apo FGFR3 crystals. X-ray data were collected on the AR-NE3A beamline at the Photon Factory or FR-E superbright X-ray generator equipped with R-Axis VII X-ray detector (Rigaku, Japan). X-ray data were processed using HKL2000⁷⁰⁾ or XDS⁷¹⁾ software. Structures were solved by molecular replacement using Phaser⁷²⁾. Ligand dictionaries were generated using AFITT-CL (OpenEye Scientific Software, USA) and models were built using Coot⁷³⁾. Refinement was conducted using Refmac⁷⁴⁾. Final structures were determined and deposited in the Protein Data Bank.

Molecular modeling

Docking models of **48**, **57a**, and **57b** with FGFR3 were prepared by MOE⁵⁷⁾ using the crystal structure of FGFR3 in complex with **48** (PDB code: 7DHL) as a template. Molecular dynamics simulations for the complexes were performed using GROMACS⁵⁸⁾ ver. 2016.1 with the AMBER 99SB-ILDN force field for proteins and the general amber force field (GAFF) for ligands.

Calculation of E_{HOMO} values

Density Functional Theory (DFT) study was performed with B3LYP/6-31G(d,p) basis set theory level using Schrödinger's Jaguar (Maestro version 12.7.156), using an Automatic mode, include Excited state type singlet, number of excited states 1, maximum TDDFT interaction 32, energy convergence threshold 5×10^{-5} , residual convergence threshold 0.01, Medium grid density, Nonrelativistic Hamiltonian.⁶⁶⁾ Highest occupied molecular orbital energy (E_{HOMO}) values were obtained with a Box size adjustment 0.0 Å/side, Grid density 5.0 pts/Å for Sp. The calculations were conducted using the substructures which contained the focused aromatic moieties with only one atom adjacent to the rings.

Pharmacology

In vitro kinase inhibitory assay

Inhibitory activity of compounds against FGFR1, 2, 3, and 4, and VEGFR2 were evaluated using an off-chip mobility shift assay. FGFR1, 2, 3, and 4, and VEGFR2 kinase (Carna Bioscience, Kobe, Japan) and test compounds were incubated for 30 or 120 minutes at room temperature (RT). After the incubation, substrate and adenosine triphosphate (ATP) at 75 μmol/L for VEGFR2, FGFR2, and FGFR3, 125 μmol/L for FGFR1, and 300 μmol/L for FGFR4 were added and the reactions were incubated for 30 minutes at RT. The kinase reaction was stopped by the addition of termination buffer. The reaction mixtures were measured using an EZ Reader II (Perkin Elmer). Wells without ATP were measured as positive control (100% inhibition), and wells treated with DMSO were measured as a negative control (0% inhibition). The IC₅₀ value of each experiment was calculated using Sigmoid-Emax non-linear regression analysis.

In vitro cell growth inhibitory assay

NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C were seeded in 96-well plates at 3000 cells per well and incubated overnight. The following day, the cells were exposed to test compounds for 5 days. Cell viability was measured using CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI, USA). Data are presented as mean values from a single experiment performed in duplicate.

UM-UC-14 cells were purchased from ECACC (Salisbury, UK). The cells were cultured according to instructions from the supplier. The cells were seeded in 384-well plates at 900 cells per well and incubated overnight. The following day, the cells were exposed to test compounds for 5 days. Cell viability was measured using CellTiter-Glo (Promega, Madison, WI, USA). Data are presented as mean values from a single experiment performed in duplicate.

Physical chemistry

Permeability

Parallel artificial membrane permeability assay (PAMPA) was conducted using STARlet 8ch (Hamilton Robotics, Reno, NV). In this assay, a 'sandwich' is formed by a 96-well microtiter plate (pION Inc., Billerica, MA) and a 96-well filter plate (pION Inc.) such that each composite well is divided into two chambers, with the donor at the bottom and acceptor at the top, separated by a lipid (pION Inc.)-coated microfilter disc. DMSO stock solutions (10 mM) of the test compounds were added to a mixture of aqueous buffer (pH 6.5) and DMSO (9:1). The drug solutions were filtered through a 96-well filter plate (PVDF, Corning Inc., Corning, NY) and added to the donor compartments. The plates were sandwiched together and acceptor buffer (pH 7.4, pION Inc.) was added to the acceptor compartment. The sandwiched plates were incubated at room temperature for 2 h under saturated water vapor conditions. After incubation, the amount of test compounds in the donor and acceptor compartments was assayed using high performance liquid chromatography (HPLC). Permeability was calculated using PAMPA Evolution software (pION Inc.).

Aqueous solubility

Solubility of the test compounds was evaluated using the Japanese Pharmacopoeia 2nd fluid for disintegration test (JP2; pH = 6.8 buffer). DMSO stock solutions (10 mM) of the test compounds were prepared and added to JP2. The solutions were shaken at 1000 rpm at 25 °C under light-protected conditions for 20 h. Precipitates were filtered through a PVDF membrane filter (pore size 0.22 µm, MERCK) and the concentration (µM) of the compound in the filtrate was assayed using HPLC.

Lipophilicity

Log $D_{7.4}$ values were calculated as the natural logarithm of the compound concentration ratio of 1-octanol to Dulbecco's phosphate buffered salts (PBS) aqueous solution (pH 7.4). The concentrations in the two layers were each evaluated by LC-MS after 10 mM DMSO stock solution of the compound was

dissolved and partitioned at 23 °C.

Pharmacokinetics

In vitro metabolic stability

To estimate the intrinsic clearance of compounds against mouse or human hepatic CYPs, test compounds (0.2 μ M) were incubated with pooled mouse or human liver microsomes (0.2 mg protein/mL), NADPH (1 mM) and EDTA (0.1 mM) in pH 7.4 Na⁺-K⁺ phosphate buffer (100 mM) at 37 °C. Incubations were conducted for 0, 15, 30, and 45 min. The peak area of the compounds and internal standard was measured using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and analyzed to calculate mCL_{int} or hCL_{int} (mL/min/kg). Values are shown as an average of duplicate experiments.

Safety

Human ether-á-go-go-related gene (*hERG*) channel inhibitory activity using QPatch system

CHO cells that stably expressed *hERG* channels were cultured in Ham's F12 containing 10% FBS, 5% ganeticin and 5% hygromycin B. Prior to experiment, the culture medium was removed, and the cells were washed with PBS. Cell was suspended with Serum Free Media containing CHO-S-SFM II, 25 mM *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 100 units/mL P/S at concentration of $2-5 \times 10^6$ cells/mL. Cell suspension, test compounds solution on plate, and extracellular and intracellular solutions were set at QPatch system.

Used solutions are followings:

Extracellular (mM): 145 NaCl, 4 KCl, 10 HEPES, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 D(+)-Glucose, adjust pH to 7.4 with NaOH

Intracellular (mM): 120 KCl, 4 Na₂-ATP, 10 ethylene glycol bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA)·tetraacetic acid, 10 HEPES, 1.75 MgCl₂, 5.374 CaCl₂, adjust pH to 7.2 with KOH

The application of pressure for forming gigaseals and the whole-cell patch clamp configuration were established using QPatch Assay Software (Sophion Bioscience).

Addition of test compounds was also set up using the QPatch Assay Software. Compounds were added to the cells with the eight pipettes *via* the QPlate integrated glass microfluidic pathways. *hERG* inhibition was evaluated using a stimulus voltage protocol consisting of a 4.8 s activating pulse to 20 mV from a holding potential of -80 mV and a 5 s test pulse to -50 mV (tail current). The

pulse pattern was repeated continuously at 15 s intervals. All QPatch data were analyzed and IC₅₀s were calculated using Sophion's QPatch Assay software.

***h*ERG current assay by the whole-cell patch-clamp technique**

The effects of **80** on the *h*ERG current were studied in *h*ERG-transfected human embryonic kidney 293 (HEK293) cells by the whole-cell patch-clamp technique. The test concentrations of **80** were set at 1, 3, and 10 μM. DMSO at 0.3 vol% was selected as the vehicle control (control). The peak amplitude of tail currents was measured in 5 separate cells in each experimental group, and the change rates (suppression rates) of the amplitude 13 minutes after beginning the application were calculated. Subsequently, the *h*ERG-current-suppression rate in each cell of the control and test-substance groups was compensated for by the mean suppression rate of the control group. Effects of **80** were evaluated using these compensated suppression rates. The mean suppression rate of the control group was 6.5%.

Animal experiments

All animal experimental procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Astellas Pharma Inc. Furthermore, Astellas Pharma Inc. Tsukuba Research Center was awarded Accreditation Status by the AAALAC International. All efforts were made to minimize the number of animals used and to avoid suffering and distress.

***In vivo* auto-phosphorylation inhibition assay**

NIH/3T3 cells exogenously overexpressing FGFR3 S249C were subcutaneously inoculated into the flank of male Balb/c nude mice (Charles River Japan, Inc.). Test compounds (30 mg/kg) were suspended in vehicle (0.5% methylcellulose solution) and administered to mice by oral gavage. Tumor samples were collected from mice 6 h after a single dose of the test compounds. Frozen tumor samples were lysed, and phosphorylated and total FGFR3 levels were measured using a sandwich ELISA assay. The data are shown as an average of 3 mice.

***In vivo* antitumor assay**

UM-UC-14 human bladder cancer cells were subcutaneously inoculated into the flank of male Balb/c nude mice (Charles River Japan, Inc.). Compound **57b** (0.1–10 mg/kg) was suspended in vehicle (0.5% methylcellulose solution) and orally administered to mice once daily from Day 1 to Day 11. Tumor volume was determined by calculating length x width² x 0.5. The data are shown as an average of 5 mice.

Mouse plasma concentration

Test compounds (30 mg/kg) were suspended in vehicle (0.5% methylcellulose solution) and orally administered to ICR mice (male, fasted). The plasma concentrations of test compounds were measured using LC-MS/MS 6 h after a single dose. The data are shown as an average of 3 mice.

Pharmacokinetic study

The pharmacokinetic profile was evaluated in SD rats (male, fasted) and beagle dogs (male, fasted). Compound **80** was intravenously or orally administered at 0.3 mg/kg to rats and at 0.1 mg/kg to dogs in water for injection containing 1% DMF, 50% PEG400, and HCl solution of 1.5 equivalent mol to **80**. Blood samples were taken at multiple time points up to 24 h for rats and 72 h for dogs after a single administration of **80**. Concentrations of unchanged compound in plasma were determined using LC-MS/MS. Pharmacokinetic parameters after intravenous and oral administration were calculated by noncompartmental analysis using Phoenix WinNonlin version 6.1 software (Pharsight Co., St. Louis, MO, USA).

Telemetry study

Transmitters of a telemetry system were fixed to 4 male beagle dogs 11 and 12 months of age, and each animal received a single oral dose of **80** at dose levels of 1, 10, and 100 mg/kg and at a dose volume of 5 mL/kg under fasting and unanesthetized conditions; the drug withdrawal period was set at 7 days. In the same manner, 0.5 w/v% methylcellulose aqueous solution used as a vehicle was administered as a control. The analysis time points (for body temperature, blood pressure, heart rate, electrocardiogram, and respiration rate), time points for blood collections to measure blood gases, blood electrolyte concentrations, and TK and for direct observation of general activity and behavior were set at before administration, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 hours after administration. The general activity and behavior were observed between 2 hours before administration and 24 hours after administration, and recorded with charge-coupled device cameras.

参考文献

- 1) Ploeg M, Aben KKH, Kiemeny LA. The present and future burden of urinary bladder cancer in the world. *World J. Urol.* **2009**, *27*, 289–293.
- 2) Maase H, Sengelov L, Roberts JT, Ricci S, Dogliotti L, Oliver T, Moore MJ, Zimmermann A, Arning M. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 4602–4608.
- 3) Bischoff CJ, Clark PE. Bladder cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2009**, *21*, 272–277.
- 4) (a) Cumberbatch MGK, Jubber I, Black PC, et al. Epidemiology of bladder cancer: a systematic review and contemporary update of risk factors in 2018. *Eur. Urol.* **2018**, *74*, 784–795.
(b) Park I, Lee JL. Systemic treatment for advanced urothelial cancer: an update on recent clinical trials and current treatment options. *Korean J. Intern. Med.* **2020**, *35*, 834–853.
- 5) (a) Sternberg CN, Yagoda A, Scher HI, et al. Preliminary results of M-VAC (methotrexate, vinblastine, doxorubicin and cisplatin) for transitional cell carcinoma of the urothelium. *J. Urol.* **1985**, *133*, 403–407.
(b) von der Maase H, Hansen SW, Roberts JT, et al. Gemcitabine and cisplatin versus methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin in advanced or metastatic bladder cancer: results of a large, randomized, multinational, multicenter, phase III study. *J. Clin. Oncol.* **2000**, *17*, 3068–3077.
(c) von der Maase H, Sengelov L, Roberts JT, et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 4602–4608.
- 6) Hussain MHA, MacVicar GR, Petrylak DP, et al. Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/*neu*-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II national cancer institute trial. *J. Clin. Oncol.* **2007**, *25*, 2218–2224.
- 7) Hahn NM, Stadler WM, Zon RT, et al. Phase II trial of cisplatin, gemcitabine, and bevacizumab as first-line therapy for metastatic urothelial carcinoma: hoosier oncology group GU 04-75. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 1525–1530.
- 8) (a) Tabernero J, Bahleda R, Dienstmann R, Infante JR, Mita A, Italiano A, Calvo E, Moreno V, Adamo B, Gazzah A, Zhong B, Platero SJ, Smit JW, Stuyckens K, Chatterjee-Kishore M, Rodon J, Peddareddigari V, Luo FR, Soria JC. Phase I dose-escalation study of JNJ-42756493, an oral pan-fibroblast growth factor receptor inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* **2015**,

33, 3401–3408.

(b) Siefker-Radtke AO, Necchi A, Park SH, García-Donas J, Huddart RA, Burgess EF, Fleming MT, Rezazadeh A, Mellado B, Varlamov S, Joshi M, Duran I, Tagawa ST, OHagan A, Avadhani AN, Zhong B, Porre PD, Loriot Y. First results from the primary analysis population of the phase 2 study of erdafitinib (JNJ-42756493) in patients with metastatic or surgically unresectable urothelial carcinoma and FGFR alterations. *ASCO Annual Meeting 2018*, Abstract# 4503.

9) Rosenberg JE, O'Donnell PH, Balar AV, et al. Pivotal trial of enfortumab vedotin in urothelial carcinoma after platinum and anti-programmed death 1/programmed death ligand 1 therapy. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 2592–2600.

10) (a) Bellmunt J, de Wit R, Vaughn DJ, et al. Pembrolizumab as second-line therapy for advanced urothelial carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1015–1026.

(b) Kim HS, Seo HK. Immune checkpoint inhibitors for urothelial carcinoma. *Investig. Clin. Urol.* **2018**, *59*, 285–296.

(c) Powles T, Durán I, van der Heijden MS, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **2018**, *391*, 748–757.

11) Bladder cancer clinical practice guideline in 2015. The Japanese Urological Association, **2015**.

12) Bedard PL, Hyman DM, Davids MS, Siu LL. Small molecules, big impact: 20 years of targeted therapy in oncology. *Lancet* **2020**, *395*, 1078–1088.

13) (a) Roskoski RJ. Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors: A 2020 update. *Pharmacol. Res.* **2020**, *152*, 104609.

(b) Tamatam R and Mohammed A. Small molecule anticancer drugs approved during 2021–2022: Synthesis and clinical applications. *Eur. J. Med. Chem.* **2024**, *272*, 116441.

14) Gavine PR, Mooney L, Kilgour E, Thomas AP, Al-Kadhimi K, Beck S, Rooney C, Coleman T, Baker D, Mellor MJ, Brooks AN, Klinowska T. AZD4547: an orally bioavailable, potent, and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor tyrosine kinase family. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2045–2056.

15) Guagnano V, Furet P, Spanka C, Bordas V, Le Douget M, Stamm C, Brueggen J, Jensen MR, Schnell C, Schmid H, Wartmann M, Berghausen J, DruECKes P, Zimmerlin A, Bussiere D, Murray J, Porta DG. Discovery of 3-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxy-phenyl)-1-{6-[4-(4-ethyl-piperazin-1-yl)-phenylamino]-pyrimidin-4-yl}-1-methyl-urea (NVP-BGJ398), a potent and selective inhibitor of the fibroblast growth factor receptor family of receptor tyrosine kinase. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 7066–7083.

16) Hall TG, Yu Y, Eathiraj S, Wang Y, Savage RE, Lapierre JM, Schwartz B,

- Abbadessa G. Preclinical activity of ARQ 087, a novel inhibitor targeting FGFR dysregulation. *PLoS ONE*. **2016**, *11*, e0162594.
- 17) Liu PCC, Koblisch H, Wu L, Bowman K, Diamond S, DiMatteo D, Zhang Y, Hansbury M, Rupa M, Wen X, Collier P, Feldman P, Klabe R, Burke KA, Soloviev M, Gardiner C, He X, Volgina A, Covington M, Ruggeri B, Wynn R, Burn TC, Scherle P, Yeleswaram S, Yao W, Huber R, Hollis G. INCB054828 (pemigatinib), a potent and selective inhibitor of fibroblast growth factor receptors 1, 2, and 3, displays activity against genetically defined tumor models. *PLoS ONE*. **2020**, *15*, e0231877.
 - 18) Watanabe MS, Yamamoto Y, Kodama K, Miyajima Y, Mikamoto M, Nakagawa T, Kuramochi H, Funasaka S, Nagao S, Hata SN, Okamoto K, Minoshima Y, Nakatani Y, Karoji Y, Ohashi I, Yamane Y, Okada T, Matsushima T, Matsui J, Iwata M, Uenaka T, Tsuruoka A. E7090, a novel selective inhibitor of fibroblast growth factor receptors, displays potent antitumor activity and prolongs survival in preclinical models. *Mol. Cancer Ther.* **2016**, *15*, 2630–2639.
 - 19) Nakanishi Y, Akiyama N, Tsukaguchi T, Fujii T, Sakata K, Sase H, Isobe T, Morikami K, Shindoh H, Mio T, Ebiike H, Taka N, Aoki Y, Ishii N. The fibroblast growth factor receptor genetic status as a potential predictor of the sensitivity to CH5183284/Debio 1347, a novel selective FGFR inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 2547–2558.
 - 20) Perera TPS, Jovcheva E, Mevellec L, Vialard J, De Lange D, Verhulst T, Paulussen C, Van De Ven K, King P, Freyne E, Rees DC, Squires M, Saxty G, Page M, Murray CW, Gilissen R, Ward G, Thompson NT, Newell DR, Cheng N, Xie L, Yang J, Platero SJ, Karkera JD, Moy C, Angibaud P, Laquerre S, Lorenzi MV. Discovery and pharmacological characterization of JNJ-42756493 (erdafitinib), a functionally selective small-molecule FGFR family inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2017**, *16*, 1010–1020.
 - 21) Collin MP, Lobell M, Hübsch W, Brohm D, Schirok H, Jautelat R, Lustig K, Bömer U, Vöhringer V, Héroult M, Grünwald S, Hess-Stumpp H. Discovery of rogaratinib (BAY 1163877): a pan-FGFR inhibitor. *Chem. Med. Chem.* **2018**, *13*, 437–445.
 - 22) Brameld KA, Owens TD, Verner E, Venetsanakos E, Bradshaw JM, Phan VT, Tam D, Leung K, Shu J, LaStant J, Loughhead DG, Ton T, Karr DE, Gerritsen ME, Goldstein DM, Funk JO. Discovery of the irreversible covalent FGFR inhibitor 8-(3-(4-acryloylpiperazin-1-yl)propyl)-6-(2,6-dichloro-3,5-dimethoxyphenyl)-2-(methylamino)pyrido[2,3-*d*]pyrimidin-7(8*H*)-one (PRN1371) for the treatment of solid tumors. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 6516–6527.
 - 23) Kalyukina M, Yosaatmadja Y, Middleditch MJ, Patterson AV, Smaill JB, Squire CJ. TAS-120 cancer target binding: defining reactivity and revealing the first

- fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) irreversible structure. *Chem. Med. Chem.* **2019**, *14*, 494–500.
- 24) (a) Dai S, Zhou Z, Chen Z, Xu G, Chen Y. Fibroblast growth factor receptors (FGFRs): structures and small molecule inhibitors. *Cells* **2019**, *8*, 614.
(b) Liu FT, Li NG, Zhang YM, Xie WC, Yang SP, Lu T, Shi ZH. Recent advance in the development of novel, selective and potent FGFR inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *186*, 111884.
(c) Goh YH, Yoo J, Noh JH, Kim C. Emerging targeted therapies in advanced bladder cancer. *Transl. Cancer Res.* **2017**, *6*, S666–S676.
- 25) Katoh M, Loriot Y, Brandi G, et al. FGFR-targeted therapeutics: clinical activity, mechanisms of resistance and new directions. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2024**, *21*, 312–329.
- 26) (a) Johnson & Johnson Home Page. BALVERSA™ (erdafitinib) receives U.S. FDA approval for the treatment of patients with locally advanced or metastatic urothelial carcinoma with certain FGFR genetic alterations. <https://www.jnj.com/balversa-erdafitinib-receives-u-s-fda-approval-for-the-treatment-of-patients-with-locally-advanced-or-metastatic-urothelial-carcinoma-with-certain-fgfr-genetic-alterations>.
(b) Jonathan SKP, Rosenberg JE, Hoffman-Censits JH, Berger R, Quinn DI, Galsky MD, Wolf J, Dittrich C, Keam B, Delord JP, Schellens JHM, Gravis G, Medioni J, Maroto P, Sriuranpong V, Charoentum C, Burris HA, Grünwald V, Petrylak D, Vaishampayan U, Gez E, Giorgi UD, Lee JL, Voortman J, Gupta S, Sharma S, Mortazavi A, Vaughn DJ, Isaacs R, Parker K, Chen X, Yu K, Porter D, Porta DG, Bajorin DF. Efficacy of BGJ398, a fibroblast growth factor receptor 1–3 inhibitor, in patients with previously treated advanced urothelial carcinoma with FGFR3 alterations. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 812–821.
(c) Necchi A, Pouessel D, Leibowitz-Amit R, Flechon A, Gupta S, Barthelemy P, Maio M, Zhu X, Asatiani E, Serbest G, Zhen H, Loriot Y. Interim results of fight-201, a phase II, open-label, multicenter study of INCB054828 in patients with metastatic or surgically unresectable urothelial carcinoma harboring fibroblast growth factor (FGF)/FGF receptor (FGFR) genetic alterations. *Annals of Oncology* **2018**, *29*, viii319–viii320.
- 27) (a) Kelley RK, Bridgewater J, Gores GJ, Zhu AX. Systemic therapies for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J. Hepatol.* **2020**, *72*, 353–363.
(b) Zhang P, Yue L, Leng QQ, et al. Targeting FGFR for cancer therapy. *J. Hematol. Oncol.* **2024**, *17*, 39.
- 28) Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signaling: from development to cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 116–129.
- 29) Katoh M. Fibroblast growth factor receptors as treatment targets in clinical oncology. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16*, 105–122.

- 30) (a) Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA. FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer. *J. Pathol.* **2007**, *213*, 91–98.
- (b) Guancial EA, Werner L, Bellmunt J, Bamias A, Choueiri TK, Ross R, Schutz FA, Park RS, O'Brien RJ, Hirsch MS, Barletta JA, Berman DM, Lis R, Loda M, Stack EC, Garraway LA, Riester M, Michor F, Kantoff PW, Rosenberg JE. FGFR3 expression in primary and metastatic urothelial carcinoma of the bladder. *Cancer Med.* **2014**, *3*, 835–844.
- 31) (a) Williams SV, Hurst CD, Knowles MA. Oncogenic FGFR3 gene fusions in bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* **2013**, *22*, 795–803.
- (b) Nakanishi Y, Akiyama N, Tsukaguchi T, Fujii T, Satoh Y, Ishii N, Aoki M. Mechanism of oncogenic signal activation by the novel fusion kinase FGFR3-BAIAP2L1. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, *14*, 704–712.
- (c) Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature* **2014**, *507*, 315–322.
- 32) Martinez R, Defnet A, Shapiro P. Avoiding or Co-Opting ATP Inhibition: Overview of Type III, IV, V, and VI Kinase Inhibitors. *Next Generation Kinase Inhibitors* **2020**, 29–59.
- 33) Attwood MM, Fabbro D, Sokolov AV, Knapp S, Schiöth HB. Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2021**, *20*, 839–861.
- 34) Grossman M, Adler E. Protein Kinase Inhibitors - Selectivity or Toxicity? *IntechOpen*, **2021**.
- 35) Kinoshita T. Structural Biology and Drug Discovery on Protein Kinases. *Journal of the Crystallographic Society of Japan* **2017**, *59*, 174–181.
- 36) Ferreira LG, Dos Santos RN, Oliva G, Andricopulo AD. Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* **2015**, *20*, 13384–13421.
- 37) Squires M, Ward G, Saxty G, Berdini V, Cleasby A, King P, Angibaud P, Perera T, Fazal L, Ross D, Jones CG, Madin A, Benning RK, Vickerstaffe E, O'Brien A, Frederickson M, Reader M, Hamlett C, Batey MA, Rich S, Carr M, Miller D, Feltell R, Thiru A, Bethell S, Devine LA, Graham BL, Pike A, Cosme J, Lewis EJ, Freyne E, Lyons J, Irving J, Murray C, Newell DR, Thompson NT. Potent, selective inhibitors of fibroblast growth factor receptor define fibroblast growth factor dependence in preclinical cancer models. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, *10*, 1542–1552.
- 38) (a) Dieci MV, Arnedos M, Andre F, Soria JC. Fibroblast growth factor receptor inhibitors as a cancer treatment: From a biologic rationale to medical perspectives. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 264–279.
- (b) Boss DS, Glen H, Beijnen JH, Keesen M, Morrison R, Tait B, Copalu W, Mazur A, Wanders J, O'Brien JP, Schellens JHM, Evans TRJ. A phase I study of E7080,

- a multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 1598–1604.
- 39) (a) Angevin E, Lin C, Pande AU, Lopez JA, Gschwend J, Harzstark AL, Shi M, Anak O, Escudier BJ. A phase I/II study of dovitinib (TKI258), a FGFR and VEGFR inhibitor, in patients (pts) with advanced or metastatic renal cell cancer: Phase I results. *J. Clin. Oncol.* **2010**, *28*, 3057.
(b) Roodhart JM, Langenberg MH, Witteveen E, Voest EE. The molecular basis of class side effects due to treatment with inhibitors of the VEGF/VEGFR pathway. *Curr. Clin. Pharmacol.* **2008**, *3*, 132–143.
- 40) (a) Renhowe PA, Pecchi S, Shafer CM, Machajewski TD, Jazan EM, Taylor C, Antonios-McCrea W, McBride CM, Frazier K, Wiesmann M, Lapointe GR, Feucht PH, Warne RL, Heise CC, Menezes D, Aardalen K, Ye H, He M, Le V, Vora J, Jansen JM, Wernette-Hammond ME, Harris AL. Design, structure-activity relationships and *in vivo* characterization of 4-amino-3-benzimidazol-2-ylhydroquinolin-2-ones: A novel class of receptor tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 278–292.
(b) Trudel S, Li ZH, Wei E, Wiesmann M, Chang H, Chen C, Reece D, Heise C, Stewart AK. CHIR-258, a novel, multitargeted tyrosine kinase inhibitor for the potential treatment of t(4,14) multiple myeloma. *Blood* **2005**, *105*, 2941–2948.
- 41) Mohammadi M, Froum S, Hamby JM, Schroeder MC, Panek RL, Lu GH, Eliseenkova AV, Green D, Schlessinger J, Hubbard SR. Crystal structure of an angiogenesis inhibitor bound to the FGF receptor tyrosine kinase domain. *The EMBO J.* **1998**, *17*, 5896–5904.
- 42) Kondoh Y, Iikubo K, Kuromitsu S, Shindo N, Soga T, Furutani T, Shimada I, Matsuya T, Kurosawa K, Kamikawa A. PCT Int Appl. WO2009008371 (A1), 2009.
- 43) Diels GSM, Ten Holte P, Freyne EJE, Grand-Perret TAR, Van Emelen K, Embrechts WCJ, Bonnet PGA. PCT Int Appl. WO2009016132 (A1), 2009.
- 44) Tomiyama T, Tomiyama Y, Yokota M, Muroga S. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 2013-10712 A, **2013**.
- 45) Shimada I, Kurosawa K, Matsuya T, Iikubo K, Kondoh Y, Kamikawa A, Tomiyama H, Iwai Y. PCT Int Appl. WO2010128659 (A1), **2010**.
- 46) Nahm S, Weinreb SM. N-methoxy-N-methylamides as effective acylating agent. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3815–3818.
- 47) Sonogashira K. Development of Pd-Cu catalyzed cross-coupling of terminal acetylenes with sp²-carbon halides. *J. Organomet. Chem.* **2002**, *653*, 46–49.
- 48) (a) Munikrishnappa CS, Puranik SB, Kumar GVS, Prasad YR. Part-1: Design, synthesis and biological evaluation of novel bromo-pyrimidine analogs as tyrosine kinase inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *119*, 70–82.
(b) Feldman RI, Wu JM, Polokoff MA, Kochanny MJ, Dinter H, Zhu D, Biroc SL, Alicke B, Bryant J, Yuan S, Buckman BO, Lentz D, Ferrer M, Whitlow M, Adler M,

- Finster S, Chang Z, Arnaiz DO. Novel small molecule inhibitors of 3-phosphoinositide-dependent kinase-1. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 19867–19874.
- 49) McTiguea M, Murray BW, Chen JH, Denga YL, Solowiej J, Kania RS. Molecular conformations, interactions, and properties associated with drug efficiency and clinical performance among VEGFR TK inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2012**, *109*, 18281–18289.
- 50) (a) Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *23*, 3–25.
(b) Doak, B. C, Zheng, J, Dobritzsch, D, Kihlberg, J. How beyond rule of 5 drugs and clinical candidates bind to their targets. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 2312–2327.
- 51) Mori M, Kaneko N, Ueno Y, Yamada M, Tanaka R, Saito R, Shimada I, Mori K, Kuromitsu S. Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia. *Invest. New Drugs* **2017**, *35*, 556–565.
- 52) Mori M, Ueno Y, Konagai S, Fushiki H, Shimada I, Kondoh Y, Saito R, Mori K, Shindou N, Soga T, Sakagami H, Furutani T, Doihara H, Kudoh M, Kuromitsu S. The selective anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase inhibitor ASP3026 induces tumor regression and prolongs survival in non-small cell lung cancer model mice. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 329–340.
- 53) Hirano T, Yasuda H, Hamamoto J, Nukaga S, Masuzawa K, Kawada I, Naoki K, Niimi T, Mimasu S, Sakagami H, Soejima K, Betsuyaku T. Pharmacological and structural characterizations of naquotinib, a novel third-generation EGFR tyrosine kinase inhibitor, in EGFR-mutated non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 740–750.
- 54) (a) Mitsunobu O, Yamada M, Mukaiyama T. Preparation of esters of phosphoric acid by the reaction of trivalent phosphorus compounds with diethyl azodicarboxylate in the presence of alcohols. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1967**, *40*, 935–939.
(b) Tsunoda T, Yamamiya Y, Itô S. 1,1'-(Azodicarbonyl)dipiperidine-tributylphosphine, a new reagent system for mitsunobu reaction. *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 1639–1642.
- 55) Ruiz-Castillo P, Buchwald SL. Applications of palladium-catalyzed C–N cross-coupling reactions. *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 12564–12649.
- 56) Pasto DJ, Taylor RT. Reduction of diimide. *Org. React.* **1991**, *40*, 91–155.
- 57) Molecular Operating Environment (MOE), 2019.01, Chemical Computing Group Inc, 1010 Sherbrooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7.

- 58) Pronk S, Páll S, Schulz R, Larsson P, Bjelkmar P, Apostolov R, Shirts MR, Smith JC, Kasson PM, van der Spoel D, Hess B, Lindahl E. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 845–854.
- 59) Allen LC. Electronegativity is the average one-electron energy of the valence-shell electrons in ground-state free atoms. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 9003–9014.
- 60) Jeffrey GA. *An introduction to hydrogen bonding*, Oxford University Press, **1997**.
- 61) (a) Abbott GW, Sesti F, Splawski I, et al. MiRP1 forms I_{Kr} potassium channels with HERG and is associated with cardiac arrhythmia. *Cell* **1999**, *97*, 175–187. (b) Fermini B, Fossa AA. The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2003**, *2*, 439–447.
- 62) ADMET Predictor (ADMET property prediction and machine learning application system), ver. 9.5.0.16, Lancaster, CA, USA: Simulations Plus, Inc, 2019.
- 63) Fernandez D, Ghanta A, Kauffman GW, et al. Physicochemical features of the hERG channel drug binding site. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 10120–10127.
- 64) Shimada I, Matsuya T, Kurosawa K, et al. PCT Int Appl. WO2012053606 (A1), **2012**.
- 65) Jamieson C, Moir EM, Rankovic Z, et al. Medicinal chemistry of hERG optimizations: highlights and hang-ups. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5029–5046.
- 66) Maestro, version 12.7.156, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2021.
- 67) Kikuchi A, Suzuki T, Nakazawa T, et al. ASP5878, a selective FGFR inhibitor, to treat FGFR3-dependent urothelial cancer with or without chemoresistance. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 236–242.
- 68) Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1093–1095.
- 69) Yamamoto N, Ryoo BY, Keam B, Kudo M, Lin CC, Kunieda F, Ball HA, Moran D, Komatsu K, Takeda K, Fukuda M, Furuse J, Morita S, Doi T. Phase 1 study of oral ASP5878, a selective small-molecule inhibitor of fibroblast growth factor receptors 1–4, as a single dose and multiple doses in patients with solid malignancies. *Invest. New Drugs* **2020**, *38*, 445–456.
- 70) Otwinowski Z and Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.
- 71) Kabsch W. Xds. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2010**, *D66*, 125–132.
- 72) Read RJ. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2001**, *D57*, 1373–1382.
- 73) Emsley P and Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2004**, *D60*, 2126–2132.

- 74) Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, et al. REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2011**, *D67*, 355–367.

謝辞

本論文の発表、及び作成にあたり、懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授 赤井 周司 博士に心より御礼申し上げます。

また、本論文に関して審査、及び貴重な御教示と御鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科教授 小比賀 聡 博士、並びに同研究科教授 有澤 光弘 博士に厚く御礼申し上げます。

本研究はアステラス製薬株式会社 研究部門で行われたものであり、開発研究 ディスカバリーインテリジェンス部長 田端 健司 博士の御指導に深謝いたします。

本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻をいただきましたアステラス製薬株式会社 開発研究 ディスカバリーインテリジェンス プラットフォームサイエンス&モダリティ室長 根来 賢二 博士、並びに創薬アクセラレーター 自然免疫制御ユニット長 小池 貴徳 博士に深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、一方ならぬご支援を賜りました元アステラス製薬株式会社 研究本部 モダリティ研究所 機能分子研究室室長 四月朔日 晋 博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の実施、及び遂行において、終始ご協力いただきました 平野 祐明 博士、久道 弘幸 氏、亀田 稔 博士、飯久保 一彦 博士、森友 博幸 氏、川本 諭一郎 博士、菊池 重俊 博士、近藤 裕 博士、寺坂 忠嗣 博士に心より感謝いたします。

本研究の実施、及び遂行において、終始ご協力いただきました 寿製薬株式会社 富山 泰 社長、野田 淳 製造部長、岩井 辰憲 研究推進部長に心より感謝いたします。

各種薬理試験を行っていただきました 鈴木 智之 氏、中澤 泰介 氏、菊地 綾 氏、小澤 徹 氏、中山 綾子 氏、飯塚 真央 氏、及びX線複合体結晶構造解析を行っていただきました 天野 靖士 氏、立石 幸寛 氏、越前 友香 氏、及びドッキング計算を行っていただきました 大野 一樹 氏、萩原 陽介 氏、檜崎 史恵 氏、及び薬物動態試験を行っていただきました 神山 佳輝 氏、山田 哲裕 氏、成富 洋一 氏、八幡 季子 氏、牛込 文彦 氏、及び物性試験を行っていただきました 濱田 憲孝 氏、山崎 浩司 氏、及び安全性試験を行っていただきました 埴岡 健一 氏、上総 勝之 氏、白川 誉史 氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、私の研究生生活を激励し、常に支えてくれた家族に深く感謝いたします。