OnCusp
Ex. 1038

国際調査機関の見解書

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００７１５２

第Ⅰ欄　見解の基礎

１．言語に関し、この見解書は以下のものに基づき作成した。

☑ 出願時の言語による国際出願

☐ 出願時の言語から国際調査のための言語である＿＿＿＿＿＿＿＿語に翻訳された、この国際出願の翻訳文（ＰＣＴ規則12.3(a)及び23.1(b)）

２．☐ この見解書は、ＰＣＴ規則 91 の規定により国際調査機関が許可した又は国際調査機関に通知された明らかな誤りの訂正を考慮して作成した（ＰＣＴ規則 43 の 2.1(b)）。

３．この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき見解書を作成した。

ａ．☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- ☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- ☐ 紙形式又はイメージファイル形式

ｂ．☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

ｃ．☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- ☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(a)）
- ☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

４．☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

５．補足意見：

国際調査機関の見解書

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００７１５２

第Ⅴ欄　新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についてのＰＣＴ規則43の2.1(a)(i)に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

１．　見解

新規性（Ｎ）	請求項	１－３６	有
	請求項		無
進歩性（ＩＳ）	請求項		有
	請求項	１－３６	無
産業上の利用可能性（ＩＡ）	請求項	１－３６	有
	請求項		無

２．　文献及び説明

文献１：JP 2017-503784 A（第一三共株式会社）2017.02.02，特許請求の範囲、［００３７］、［００４７］、実施例１６ａ及び１９
& US 2017/0021031 A1 & WO 2015/155998 A1(Claims,[0037],[0047], Examples 16a and 19) & EP 3129063 A1

文献２：米阪仁雄，非小細胞肺癌における抗HER3抗体patritumabによるEGFR阻害剤耐性の克服について，肺癌，2015，第55巻，第948-955頁，第949頁左欄第1段落、第951頁左欄第2段落

請求項１－３６に係る発明は、文献１、２から、進歩性を有しない。

文献１には、抗ＨＥＲ３抗体－抗腫瘍性化合物コンジュゲートは、肺癌に適用するための抗癌薬であること、当該抗体は重鎖カルボキシル末端のリシン残基が欠失しているものでもよいことが記載されており、実施例には、配列番号５８３で示される重鎖及び配列番号５８４で示される軽鎖を含むＵ１－５９抗体を、リンカーを介してエキサテカンに結合させたコンジュゲート（１６ａ）は、薬物平均結合数が７．８であったこと、当該コンジュゲートとゲフィチニブとの併用によるin vivo抗腫瘍併用効果を確認したことが、記載されている。文献１における「配列番号５８３」及び「配列番号５８４」は、請求項１１及び２９における「配列番号９」及び「配列番号１０」に、それぞれ相当する。また、文献１における「コンジュゲート（１６ａ）」は、請求項８及び２６における「抗ＨＥＲ３抗体－薬物コンジュゲート」に、相当する。

請求項１－３６に係る発明は、ＥＧＦＲチロシンキナーゼ阻害剤（ＥＧＦＲ－ＴＫＩ）抵抗性の非小細胞肺癌を治療するものである点において、文献１に記載のものと相違する。

しかし、文献２には、非小細胞肺癌には、ゲフィチニブまたはエルロチニブ等のＥＧＦＲ－ＴＫＩによる薬物療法が標準治療であるが、当該治療により癌細胞はやがて同剤に対して耐性を獲得すること、当該耐性をきたす機序の一つとして、ＨＥＲ３受容体のリガンドであるヘレグリンの過剰発現と、それに伴うＨＥＲ３受容体の活性化が同定されていること、この耐性の克服には、抗ＨＥＲ３抗体とＥＧＦＲ－ＴＫＩとの併用療法が有用であること、Ｔ７９０Ｍ遺伝子変異を獲得した細胞株は当該併用療法に対して耐性であったことが、記載されている。

（補充欄に続く）

国際調査機関の見解書

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００７１５２

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第　　欄の続き

A61K39/395(2006.01)i, A61K31/506(2006.01)i, A61K31/517(2006.01)i, A61K31/535(2006.01)i, A61K45/00(2006.01)i, A61K47/68(2017.01)i, A61P11/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i

国際調査機関の見解書

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／００７１５２

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第　Ⅴ　欄の続き

そうすると、文献１に記載の肺癌に適用するための抗ＨＥＲ３抗体－抗腫瘍性化合物コンジュゲートとゲフィチニブとの併用において、当該肺癌として、同じく抗ＨＥＲ３抗体とＥＧＦＲ－ＴＫＩとの併用療法が有効な肺癌である文献２に記載のＥＧＦＲ－ＴＫＩ耐性の非小細胞肺癌、特にＴ７９０Ｍ遺伝子変異陰性のものを採用し、実際にその効果を確認してみることは、当業者が容易になし得ることであるし、様々な公知のＥＧＦＲ－ＴＫＩと併用してみることに、格別の困難性はない。

そして、そのことによる効果も格別のものとは認められない。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/006421

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28(2006.01)i, *A61K31/4745*(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61K47/48*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/28, A61K31/4745, A61K39/395, A61K47/48, A61P35/00, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0293513 A1 (IMMUNOMEDICS, INC.), 01 December 2011 (01.12.2011), claim 1; drawings & JP 2009-531325 A & JP 5314590 B2 & JP 2008-538747 A & JP 2008-542194 A & JP 4955652 B2 & JP 5011277 B2 & JP 2009-514813 A & JP 2009-517337 A & JP 5231231 B2 & JP 5498018 B2 & JP 2009-519931 A & JP 5090366 B2 & JP 2006-511526 A & JP 4959136 B2 & JP 2011-500842 A & JP 2014-129395 A & JP 5577558 B2 & JP 2011-517684 A & JP 2011-530536 A & JP 2013-503184 A & JP 2013-503200 A & US 2010/0104589 A1 & US 2008/0166363 A1 & US 2006/0193865 A1 & US 2004/0185053 A1 & US 2011/0305631 A1 & US 2012/0082617 A1 & US 2013/0090458 A1	1-26

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 March 2015 (02.03.15)	17 March 2015 (17.03.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/006421

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& US 2013/0177526 A1 & US 2014/0058067 A1 & US 2014/0286860 A1 & US 2014/0328752 A1 & US 2011/0070156 A1 & US 2013/0209356 A1 & US 2014/0044640 A1 & US 2010/0015046 A1 & US 2012/0328564 A1 & US 2014/0099258 A1 & US 2009/0291093 A1 & US 2012/0328634 A1 & US 2013/0216561 A1 & US 2014/0004078 A1 & US 2006/0228300 A1 & US 2006/0228357 A1 & US 2009/0060862 A1 & US 2009/0191225 A1 & US 2009/0202487 A1 & US 2010/0189689 A1 & US 2010/0221210 A1 & US 2010/0233779 A1 & US 2010/0261885 A1 & US 2010/0266496 A1 & US 2011/0008251 A1 & US 2011/0020273 A1 & US 2011/0076233 A1 & US 2011/0123436 A1 & US 2011/0143417 A1 & US 2011/0158905 A1 & US 2011/0256053 A1 & US 2011/0274704 A1 & US 2011/0300066 A1 & US 2012/0009149 A1 & US 2012/0082685 A1 & US 2012/0040431 A1 & US 2012/0093769 A1 & US 2011/0300105 A1 & US 2012/0196346 A1 & US 2011/0236352 A1 & US 2011/0318306 A1 & US 2012/0225032 A1 & US 2012/0237442 A1 & US 2012/0276100 A1 & US 2013/0039861 A1 & US 2013/0072659 A1 & US 2013/0078183 A1 & US 2013/0109073 A1 & US 2013/0143296 A1 & US 2013/0171064 A1 & US 2013/0177532 A1 & US 2013/0217091 A1 & US 2013/0280250 A1 & US 2013/0289244 A1 & US 2013/0295005 A1 & US 2014/0038261 A1 & US 2014/0086832 A1 & US 2014/0161766 A1 & US 2007/0086942 A1 & US 2007/0087001 A1 & US 2007/0140966 A1 & US 2009/0202433 A1 & US 2009/0269277 A1 & US 2009/0304580 A1 & US 2010/0068137 A1 & US 2010/0189641 A1 & US 2010/0216662 A1 & US 2011/0110851 A1 & US 2011/0189083 A1 & US 2011/0189268 A1 & US 2011/0195020 A1 & US 2012/0276608 A1 & US 2013/0095033 A1 & US 2013/0164816 A1 & US 2014/0037543 A1 & US 2014/0045242 A1 & US 2014/0294722 A & US 2013/0136718 A1 & US 2011/0165072 A1 & US 2012/0141375 A1 & US 2014/0112864 A1 & US 2014/0227179 A1 & US 2011/0064754 A1 & EP 2506881 A1 & EP 2271359 A1 & EP 1994057 A1 & EP 2396036 A1 & EP 1874358 A1 & EP 1874824 A1 & EP 1937724 A1 & EP 1937851 A1 & EP 1959993 A1 & EP 2674440 A2 & EP 1572242 A1 & EP 2197468 A1 & EP 2271364 A1 & EP 2331134 A1 & EP 2473186 A1 & EP 2473187 A1 & EP 2509629 A1 & EP 2509630 1A & EP 2605788 A1 & EP 2635300 A1 & EP 2806887 A1 & EP 2764362 A1 & EP 2416807 A1 & EP 2496256 A1 & EP 2785382 A1	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/006421

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& WO 2011/068845 A1 & WO 2009/100194 A2 & WO 2007/112193 A2 & WO 2010/093395 A1 & WO 2006/107617 A2 & WO 2006/107786 A2 & WO 2007/046893 A2 & WO 2007/047609 A2 & WO 2007/075270 A2 & WO 2004/054622 A1 & WO 2009/055653 A1 & WO 2009/126558 A1 & WO 2010/017500 A2 & WO 2011/025904 A1 & WO 2011/026026 A1 & WO 2011/072114 A1 & WO 2011/072124 A1 & WO 2012/024223 A2 & WO 2012/061548 A1 & WO 2013/112801 A1 & WO 2013/052484 A1 & WO 2010/117984 A1 & WO 2011/056721 A2 & WO 2013/082254 A1 & WO 2014/165506 A1	
Y	Ikuo MITSUI et al., A New Water-soluble Camptothecin Derivative, DX-8951f, Exhibits Potent Antitumor Activity against Human Tumors in vitro and in vivo, Jpn. J. Cancer Res., 1995, 86, p.776-782	1-26
Y	JP 2009-538629 A (Genentech, Inc.), 12 November 2009 (12.11.2009), paragraphs [0267] to [0281] & JP 2013-56896 A & US 2008/0050310 A1 & US 2011/0142859 A1 & US 2012/0329094 A1 & US 2013/0171170 A1 & US 2014/0127197 A1 & EP 2032606 A1 & EP 2446904 A2 & EP 2447282 A2 & WO 2007/140371 A2	1-26
Y	JP 2008-521828 A (Seattle Genetics, Inc.), 26 June 2008 (26.06.2008), claims 19 to 21; paragraphs [0137] to [0145] & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A1 & WO 2006/065533 A2	1-26
Y	JP 2005-511627 A (Seattle Genetics, Inc.), 28 April 2005 (28.04.2005), paragraphs [0159] to [0206] & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A1 & WO 2003/043583 A2	1-26
Y	WO 2000/025825 A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 May 2000 (11.05.2000), table 1; page 23 & US 2004/0192644 A1 & US 6811996 B1 & EP 1155702 A1 & EP 1619210 A1	1-26
Y	JP 2012-100671 A (Amgen Inc.), 31 May 2012 (31.05.2012), paragraphs [0187], [0188] & JP 2008-538506 A & JP 5087536 B2 & US 2007/0071764 A1 & US 2011/0045587 A1 & EP 1896080 A1 & WO 2006/116156 A2	1-26

OnCusp
Ex. 1038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/006421

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-534906 A (Indiana University Research & Technology Corp.), 09 September 2013 (09.09.2013), paragraph [0226] & US 2013/0123178 A1 & EP 2569000 A1 & WO 2011/143209 A1	1-26
P,A	WO 2014/061277 A1 (Daiichi Sankyo Co., Ltd.), 24 April 2014 (24.04.2014), entire text & TW 201420118 A	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/006421

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [x] Claims Nos.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 27 pertains to a method for treatment of the human body or animal body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

特 許 協 力 条 約

ＰＣＴ

国際調査報告

（法８条、法施行規則第40、41条）
〔ＰＣＴ18条、ＰＣＴ規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号　PD20-9007WO	今後の手続きについては、様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０ 及び下記５を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／００６４２１	国際出願日 (日.月.年)　２４．１２．２０１４	優先日 (日.月.年)　２５．１２．２０１３
出願人（氏名又は名称） 第一三共株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（ＰＣＴ18条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で　6　ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

１．国際調査報告の基礎
ａ．言語に関し、この国際調査は以下のものに基づき行った。
☑ 出願時の言語による国際出願
☐ 出願時の言語から国際調査のための言語である＿＿＿＿＿＿＿＿ 語に翻訳された、
この国際出願の翻訳文（ＰＣＴ規則12.3(a)及び23.1(b)）

ｂ．☐ この国際調査報告は、ＰＣＴ規則91の規定により国際調査機関が認めた又は国際調査機関に通知された明らかな誤りの訂正を考慮して作成した（ＰＣＴ規則43.6の2(a)）。

ｃ．☑ この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる（第Ｉ欄参照）。

２．☑ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ⅱ欄参照）。

３．☐ 発明の単一性が欠如している（第Ⅲ欄参照）。

４．発明の名称は
☑ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

５．要約は
☑ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第Ⅳ欄に示されているように、法施行規則第47条第１項（ＰＣＴ規則38.2）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から１月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

６．図面に関して
ａ．要約書とともに公表される図は、
第＿＿＿＿図とする。☐ 出願人が示したとおりである。
☐ 出願人は図を示さなかったので、国際調査機関が選択した。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表しているので、国際調査機関が選択した。

ｂ．☑ 要約とともに公表される図はない。

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／００６４２１

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

１．この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

ａ．提出手段　☐ 紙形式

☑ 電子形式

ｂ．提出時期　☑ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／００６４２１

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☑ 請求項　２７　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項27は治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

2．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／００６４２１

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28, A61K31/4745, A61K39/395, A61K47/48, A61P35/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN)

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	US 2011/0293513 A1 (IMMUNOMEDICS, INC.) 2011.12.01, 請求項１、図面 & JP 2009-531325 A & JP 5314590 B2 & JP 2008-538747 A & JP 2008-542194 A & JP 4955652 B2 & JP 5011277 B2 & JP 2009-514813 A & JP 2009-517337 A & JP 5231231 B2 & JP 5498018 B2 & JP 2009-519931 A & JP 5090366 B2 & JP 2006-511526 A & JP 4959136 B2 & JP 2011-500842 A & JP 2014-129395 A & JP 5577558 B2 & JP 2011-517684 A & JP 2011-530536 A & JP 2013-503184 A & JP 2013-503200 A & US 2010/0104589 A1 & US 2008/0166363 A1 & US	1-26

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０２．０３．２０１５	国際調査報告の発送日 １７．０３．２０１５
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３３３６ 松浦　安紀子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

国際調査報告 | 国際出願番号 PCT／JP2014／006421

C（続き）． 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	2006/0193865 A1 & US 2004/0185053 A1 & US 2011/0305631 A1 & US 2012/0082617 A1 & US 2013/0090458 A1 & US 2013/0177526 A1 & US 2014/0058067 A1 & US 2014/0286860 A1 & US 2014/0328752 A1 & US 2011/0070156 A1 & US 2013/0209356 A1 & US 2014/0044640 A1 & US 2010/0015046 A1 & US 2012/0328564 A1 & US 2014/0099258 A1 & US 2009/0291093 A1 & US 2012/0328634 A1 & US 2013/0216561 A1 & US 2014/0004078 A1 & US 2006/0228300 A1 & US 2006/0228357 A1 & US 2009/0060862 A1 & US 2009/0191225 A1 & US 2009/0202487 A1 & US 2010/0189689 A1 & US 2010/0221210 A1 & US 2010/0233779 A1 & US 2010/0261885 A1 & US 2010/0266496 A1 & US 2011/0008251 A1 & US 2011/0020273 A1 & US 2011/0076233 A1 & US 2011/0123436 A1 & US 2011/0143417 A1 & US 2011/0158905 A1 & US 2011/0256053 A1 & US 2011/0274704 A1 & US 2011/0300066 A1 & US 2012/0009149 A1 & US 2012/0082685 A1 & US 2012/0040431 A1 & US 2012/0093769 A1 & US 2011/0300105 A1 & US 2012/0196346 A1 & US 2011/0236352 A1 & US 2011/0318306 A1 & US 2012/0225032 A1 & US 2012/0237442 A1 & US 2012/0276100 A1 & US 2013/0039861 A1 & US 2013/0072659 A1 & US 2013/0078183 A1 & US 2013/0109073 A1 & US 2013/0143296 A1 & US 2013/0171064 A1 & US 2013/0177532 A1 & US 2013/0217091 A1 & US 2013/0280250 A1 & US 2013/0289244 A1 & US 2013/0295005 A1 & US 2014/0038261 A1 & US 2014/0086832 A1 & US 2014/0161766 A1 & US 2007/0086942 A1 & US 2007/0087001 A1 & US 2007/0140966 A1 & US 2009/0202433 A1 & US 2009/0269277 A1 & US 2009/0304580 A1 & US 2010/0068137 A1 & US 2010/0189641 A1 & US 2010/0216662 A1 & US 2011/0110851 A1 & US 2011/0189083 A1 & US 2011/0189268 A1 & US 2011/0195020 A1 & US 2012/0276608 A1 & US 2013/0095033 A1 & US 2013/0164816 A1 & US 2014/0037543 A1 & US 2014/0045242 A1 & US 2014/0294722 A & US 2013/0136718 A1 & US 2011/0165072 A1 & US 2012/0141375 A1 & US 2014/0112864 A1 & US 2014/0227179 A1 & US 2011/0064754 A1 & EP 2506881 A1 & EP 2271359 A1 & EP 1994057 A1 & EP 2396036 A1 & EP 1874358 A1 & EP 1874824 A1 & EP 1937724 A1 & EP 1937851 A1 & EP 1959993 A1 & EP 2674440 A2 & EP 1572242 A1 & EP 2197468 A1 & EP 2271364 A1 & EP 2331134 A1 & EP 2473186 A1 & EP 2473187 A1 & EP 2509629 A1 & EP 2509630 1A & EP 2605788 A1 & EP 2635300 A1 & EP 2806887 A1 & EP 2764362 A1 & EP 2416807 A1 & EP 2496256 A1 & EP 2785382 A1 & WO 2011/068845 A1 & WO 2009/100194 A2 & WO 2007/112193 A2 & WO 2010/093395 A1 & WO 2006/107617 A2 & WO 2006/107786 A2 & WO 2007/046893 A2 & WO 2007/047609 A2 & WO 2007/075270 A2 & WO 2004/054622 A1 & WO 2009/055653 A1 & WO 2009/126558 A1 & WO 2010/017500 A2 & WO 2011/025904 A1 & WO 2011/026026 A1 & WO 2011/072114 A1 & WO	

国際調査報告　　国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／００６４２１

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
	2011/072124 A1 & WO 2012/024223 A2 & WO 2012/061548 A1 & WO 2013/112801 A1 & WO 2013/052484 A1 & WO 2010/117984 A1 & WO 2011/056721 A2 & WO 2013/082254 A1 & WO 2014/165506 A1	
Y	Ikuo MITSUI et al., A New Water-soluble Camptothecin Derivative, DX-8951f, Exhibits Potent Antitumor Activity against Human Tumors in vitro and in vivo, Jpn. J. Cancer Res., 1995, 86, p.776-782	1-26
Y	JP 2009-538629 A（ジェネンテック・インコーポレーテッド）2009.11.12, ［０２６７］－［０２８１］ & JP 2013-56896 A & US 2008/0050310 A1 & US 2011/0142859 A1 & US 2012/0329094 A1 & US 2013/0171170 A1 & US 2014/0127197 A1 & EP 2032606 A1 & EP 2446904 A2 & EP 2447282 A2 & WO 2007/140371 A2	1-26
Y	JP 2008-521828 A（シアトル　ジェネティックス，インコーポレイテッド）2008.06.26, 請求項１９－２１、［０１３７］－［０１４５］ & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A1 & WO 2006/065533 A2	1-26
Y	JP 2005-511627 A（シアトル　ジェネティクス，インコーポレーテッド）2005.04.28, ［０１５９］－［０２０６］ & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A1 & WO 2003/043583 A2	1-26
Y	WO 2000/025825 A1（第一製薬株式会社）2000.05.11, 表１、第２３頁 & US 2004/0192644 A1 & US 6811996 B1 & EP 1155702 A1 & EP 1619210 A1	1-26
Y	JP 2012-100671 A（アムジエン・インコーポレーテツド）2012.05.31, ［０１８７］、［０１８８］ & JP 2008-538506 A & JP 5087536 B2 & US 2007/0071764 A1 & US 2011/0045587 A1 & EP 1896080 A1 & WO 2006/116156 A2	1-26
Y	JP 2013-534906 A（インディアナ　ユニバーシティー　リサーチ　アンド　テクノロジー　コーポレーション）2013.09.09, ［０２２６］ & US 2013/0123178 A1 & EP 2569000 A1 & WO 2011/143209 A1	1-26
P, A	WO 2014/061277 A1（第一三共株式会社）2014.04.24, 全文 & TW 201420118 A	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006069

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61K31/4745*(2006.01)n, *A61K31/48*(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, A61K31/4745, A61K31/48

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY(STN), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2009-538629 A (Genentech, Inc.), 12 November 2009 (12.11.2009), entire text & US 2008/0050310 A1 & EP 2032606 A2 & WO 2007/140371 A2 & CN 101490087 A	49 1-33,35-48
X Y	JP 2008-521828 A (Seattle Genetics, Inc.), 26 June 2008 (26.06.2008), entire text & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A2 & WO 2006/065533 A2	49 1-33,35-48
X Y	JP 2005-511627 A (Seattle Genetics, Inc.), 28 April 2005 (28.04.2005), entire text & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A2 & WO 2003/043583 A2	49 1-33,35-48

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 December, 2013 (04.12.13)	17 December, 2013 (17.12.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

OnCusp
Ex. 1038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006069

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2002/000734 A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 January 2002 (03.01.2002), entire text & US 2003/0166513 A1 & EP 1298145 A1 & CN 1449412 A	1-33,35-48
Y	JP 11-092405 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 April 1999 (06.04.1999), entire text (Family: none)	1-33,35-48
Y	JP 10-095802 A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 14 April 1998 (14.04.1998), entire text & US 5892043 A & EP 781781 A2 & CN 1158334 A	1-33,35-48
A	DOSIO, F. et al., "Antibody-targeted leucinostatin A.", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 1994.11, Vol.32, No.1, P.37-44	49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006069

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 34
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 34 pertains to a therapeutic method for a human being and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

OnCusp
Ex. 1038

特 許 協 力 条 約

ＰＣＴ

国際調査報告

（法８条、法施行規則第40、41条）
［ＰＣＴ18条、ＰＣＴ規則43、44］

出願人又は代理人 の書類記号　PD20-9003WO	今後の手続きについては、様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０ 及び下記５を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６０６９	国際出願日 (日.月.年)　１０．１０．２０１３	優先日 (日.月.年)　１１．１０．２０１２
出願人（氏名又は名称） 第一三共株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（ＰＣＴ18条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で　5　ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

１．国際調査報告の基礎

ａ．言語に関し、この国際調査は以下のものに基づき行った。

☑ 出願時の言語による国際出願

☐ 出願時の言語から国際調査のための言語である＿＿＿＿＿＿＿＿ 語に翻訳された、
この国際出願の翻訳文（ＰＣＴ規則12.3(a)及び23.1(b)）

ｂ．☐ この国際調査報告は、ＰＣＴ規則91の規定により国際調査機関が認めた又は国際調査機関に通知された明らかな誤りの訂正を考慮して作成した（ＰＣＴ規則43.6の2(a)）。

ｃ．☑ この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる（第Ｉ欄参照）。

２．☑ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ⅱ欄参照）。

３．☐ 発明の単一性が欠如している（第Ⅲ欄参照）。

４．発明の名称は

☑ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

５．要約は

☑ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第Ⅳ欄に示されているように、法施行規則第47条第１項（ＰＣＴ規則38.2）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から１月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

６．図面に関して

ａ．要約書とともに公表される図は、
第 ＿＿＿＿ 図とする。

☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかったので、国際調査機関が選択した。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表しているので、国際調査機関が選択した。

ｂ．☑ 要約とともに公表される図はない。

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６０６９

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

１．この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

ａ．提出手段　　☐ 紙形式

☑ 電子形式

ｂ．提出時期　　☑ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６０６９

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　３４　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項３４はヒトに対する治療方法に関するものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及び［PCT規則39.1(iv)］の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６０６９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)n, A61K31/48(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, A61K31/4745, A61K31/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY(STN), PubMed

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	JP 2009-538629 A（ジェネンテック・インコーポレーテッド）2009.11.12, 全文 & US 2008/0050310 A1 & EP 2032606 A2 & WO 2007/140371 A2 & CN 101490087 A	49 1-33,35-48
X Y	JP 2008-521828 A（シアトル　ジェネティックス，インコーポレイテッド）2008.06.26, 全文 & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A2 & WO 2006/065533 A2	49 1-33,35-48

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０４．１２．２０１３	国際調査報告の発送日 １７．１２．２０１３
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４１５５ 野村　英雄 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６０６９

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X Y	JP 2005-511627 A（シアトル　ジェネティクス，インコーポレーテッド）2005.04.28，全文 & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A2 & WO 2003/043583 A2	49 1-33,35-48
Y	WO 2002/000734 A1（第一製薬株式会社）2002.01.03，全文 & US 2003/0166513 A1 & EP 1298145 A1 & CN 1449412 A	1-33,35-48
Y	JP 11-092405 A（第一製薬株式会社）1999.04.06，全文 （ファミリーなし）	1-33,35-48
Y	JP 10-095802 A（田辺製薬株式会社）1998.04.14，全文 & US 5892043 A & EP 781781 A2 & CN 1158334 A	1-33,35-48
A	DOSIO, F. et al., "Antibody-targeted leucinostatin A.", JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, 1994.11, Vol.32, No.1, P.37-44	49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006178

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61K31/4745*(2006.01)n, *A61K31/48*(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, A61K31/4745, A61K31/48

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY(STN), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP 2009-538629 A (Genentech, Inc.), 12 November 2009 (12.11.2009), entire text & US 2008/0050310 A1 & EP 2032606 A2 & WO 2007/140371 A2 & CN 101490087 A	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 2008-521828 A (Seattle Genetics, Inc.), 26 June 2008 (26.06.2008), entire text & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A2 & WO 2006/065533 A2	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 2005-511627 A (Seattle Genetics, Inc.), 28 April 2005 (28.04.2005), entire text & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A2 & WO 2003/043583 A2	1-30,33-52 31-32

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
04 December, 2013 (04.12.13)	17 December, 2013 (17.12.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

OnCusp
Ex. 1038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006178

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2002/000734 A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 03 January 2002 (03.01.2002), entire text & US 2003/0166513 A1 & EP 1298145 A1 & CN 1449412 A	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 11-092405 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 April 1999 (06.04.1999), entire text (Family: none)	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 10-095802 A (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 14 April 1998 (14.04.1998), entire text & US 5892043 A & EP 781781 A2 & CN 1158334 A	1-30,33-52 31-32

OnCusp
Ex. 1038

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/006178

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 53-54
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 53-54 pertain to therapeutic methods for a human being and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and [PCT Rule 39.1(iv)].

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

OnCusp
Ex. 1038

特 許 協 力 条 約

ＰＣＴ

国際調査報告

（法８条、法施行規則第40、41条）
［ＰＣＴ18条、ＰＣＴ規則43、44］

出願人又は代理人 の書類記号　PD20-9004WO	今後の手続きについては、様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０ 及び下記５を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６１７８	国際出願日 (日.月.年)　１７．１０．２０１３	優先日 (日.月.年)　１９．１０．２０１２
出願人（氏名又は名称） 第一三共株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（ＰＣＴ18条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で　5　ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

１．国際調査報告の基礎

ａ．言語に関し、この国際調査は以下のものに基づき行った。

☑ 出願時の言語による国際出願

☐ 出願時の言語から国際調査のための言語である＿＿＿＿＿＿＿＿ 語に翻訳された、
この国際出願の翻訳文（ＰＣＴ規則12.3(a)及び23.1(b)）

ｂ．☐ この国際調査報告は、ＰＣＴ規則91の規定により国際調査機関が認めた又は国際調査機関に通知された明らかな誤りの訂正を考慮して作成した（ＰＣＴ規則43.6の2(a)）。

ｃ．☑ この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる（第Ｉ欄参照）。

２．☑ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ⅱ欄参照）。

３．☐ 発明の単一性が欠如している（第Ⅲ欄参照）。

４．発明の名称は

☑ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

５．要約は

☑ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第Ⅳ欄に示されているように、法施行規則第47条第１項（ＰＣＴ規則38.2）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から１月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

６．図面に関して

ａ．要約書とともに公表される図は、
第 ＿＿＿＿ 図とする。

☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかったので、国際調査機関が選択した。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表しているので、国際調査機関が選択した。

ｂ．☑ 要約とともに公表される図はない。

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６１７８

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

１．この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

ａ．提出手段　☐ 紙形式

☑ 電子形式

ｂ．提出時期　☑ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６１７８

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求項　５３－５４　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項５３－５４はヒトに対する治療方法に関するものであるから、PCT17条(2)(a)(i)及び［PCT規則39.1(iv)］の規定により、この国際調査機関が国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６１７８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)n, A61K31/48(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28, A61K39/395, A61P35/00, A61K31/4745, A61K31/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY(STN), PubMed

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y A	JP 2009-538629 A（ジェネンテック・インコーポレーテッド）2009.11.12, 全文 & US 2008/0050310 A1 & EP 2032606 A2 & WO 2007/140371 A2 & CN 101490087 A	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 2008-521828 A（シアトル　ジェネティックス，インコーポレイテッド）2008.06.26, 全文 & US 2008/0305044 A1 & EP 1817341 A2 & WO 2006/065533 A2	1-30,33-52 31-32

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０４．１２．２０１３	国際調査報告の発送日 １７．１２．２０１３
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｂ　４１５５ 野村　英雄 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／００６１７８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y A	JP 2005-511627 A（シアトル　ジェネティクス，インコーポレーテッド）2005.04.28，全文 & US 2005/0123536 A1 & EP 1482972 A2 & WO 2003/043583 A2	1-30,33-52 31-32
Y A	WO 2002/000734 A1（第一製薬株式会社）2002.01.03，全文 & US 2003/0166513 A1 & EP 1298145 A1 & CN 1449412 A	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 11-092405 A（第一製薬株式会社）1999.04.06，全文 （ファミリーなし）	1-30,33-52 31-32
Y A	JP 10-095802 A（田辺製薬株式会社）1998.04.14，全文 & US 5892043 A & EP 781781 A2 & CN 1158334 A	1-30,33-52 31-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/000355

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K16/28(2006.01)i, *A61K31/4745*(2006.01)i, *A61K39/395*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *C07D491/052*(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2006-511526 A (Immunomedics, Inc.), 06 April 2006 (06.04.2006), claims; paragraphs [0027] to [0032] & WO 2004/054622 A1 & EP 1572242 A & US 2004/0185053 A1 & US 2009/0291093 A1 & US 2012/0328634 A1 & US 2013/0216561 A1 & US 2014/0004078 A1	1-26
A	JP 2013-500253 A (Enzon Pharmaceuticals, Inc.), 07 January 2013 (07.01.2013), claims; paragraphs [0008] to [0023] & WO 2011/011474 A1 & US 2012/0171201 A1 & EP 2456464 A & CN 102481364 A & KR 10-2012-0104158 A	1-26

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

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
14 April 2015 (14.04.15)	21 April 2015 (21.04.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/000355

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-534535 A (Covx Technologies Ireland, Ltd.), 05 September 2013 (05.09.2013), claims & US 2012/0201809 A1 & WO 2012/007896 A1 & EP 2593142 A & CN 103096933 A & KR 10-2013-0050966 A	1-26
P,A	WO 2014/107024 A1 (CELLTRION), 10 July 2014 (10.07.2014), claims; abstract & KR 10-2014-0088828 A & KR 10-2014-0088841 A & KR 10-2014-0088842 A & KR 10-2014-0088843 A	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/000355

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [x] Claims Nos.: 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 27 pertains to a method for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

特 許 協 力 条 約

ＰＣＴ

国際調査報告

（法８条、法施行規則第40、41条）
〔ＰＣＴ18条、ＰＣＴ規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号　PD20-9008WO	今後の手続きについては、様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２２０ 及び下記５を参照すること。	
国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０００３５５	国際出願日 (日.月.年)　２８．０１．２０１５	優先日 (日.月.年)　３１．０１．２０１４
出願人（氏名又は名称） 第一三共株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条（ＰＣＴ18条）の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で　5　ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

１．国際調査報告の基礎
ａ．言語に関し、この国際調査は以下のものに基づき行った。
☑ 出願時の言語による国際出願
☐ 出願時の言語から国際調査のための言語である＿＿＿＿＿＿＿＿ 語に翻訳された、
この国際出願の翻訳文（ＰＣＴ規則12.3(a)及び23.1(b)）

ｂ．☐ この国際調査報告は、ＰＣＴ規則91の規定により国際調査機関が認めた又は国際調査機関に通知された明らかな誤りの訂正を考慮して作成した（ＰＣＴ規則43.6の2(a)）。

ｃ．☑ この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる（第Ｉ欄参照）。

２．☑ 請求の範囲の一部の調査ができない（第Ⅱ欄参照）。

３．☐ 発明の単一性が欠如している（第Ⅲ欄参照）。

４．発明の名称は
☑ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

５．要約は
☑ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第Ⅳ欄に示されているように、法施行規則第47条第１項（ＰＣＴ規則38.2）の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から１月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

６．図面に関して
ａ．要約書とともに公表される図は、
第＿＿＿＿図とする。☐ 出願人が示したとおりである。
☐ 出願人は図を示さなかったので、国際調査機関が選択した。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表しているので、国際調査機関が選択した。

ｂ．☑ 要約とともに公表される図はない。

国際調査報告　　国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０００３５５

第Ⅰ欄　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

１．この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、提出された以下の配列表に基づき国際調査を行った。

ａ．提出手段　　☐ 紙形式

☑ 電子形式

ｂ．提出時期　　☑ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

２．☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しを提出した場合、出願後に提出した配列の写し若しくは追加して提出した配列の写しが、出願時に提出した配列と同一である旨又は出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

３．補足意見：

国際調査報告　　国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０００３５５

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1．☑ 請求項　27　は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項27は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 第17 条(2)(a)(i)及びPCT 規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2．☐ 請求項　　は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3．☐ 請求項　　は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。

2．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０００３５５

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K16/28(2006.01)i, A61K31/4745(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07D491/052(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C07K, A61K, A61P

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報　１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報　１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報　１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報　１９９４－２０１５年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2006-511526 A (イミューノメディクス、インコーポレイテッド) 2006.04.06, 特許請求の範囲、【００２７】－【００３２】 & WO 2004/054622 A1 & EP 1572242 A & US 2004/0185053 A1 & US 2009/0291093 A1 & US 2012/0328634 A1 & US 2013/0216561 A1 & US 2014/0004078 A1	1 - 26

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１４．０４．２０１５	２１．０４．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	山本　晋也	４Ｎ	３３４１
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８		

OnCusp
Ex. 1038

国際調査報告　　国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／０００３５５

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	JP 2013-500253 A (エンゾン　ファーマシューティカルズ，インコーポレーテッド) 2013.01.07, 特許請求の範囲、【０００８】－【００２３】 & WO 2011/011474 A1 & US 2012/0171201 A1 & EP 2456464 A & CN 102481364 A & KR 10-2012-0104158 A	1 - 26
A	JP 2013-534535 A (コヴェックス・テクノロジーズ・アイルランド・リミテッド) 2013.09.05, 特許請求の範囲 & US 2012/0201809 A1 & WO 2012/007896 A1 & EP 2593142 A & CN 103096933 A & KR 10-2013-0050966 A	1 - 26
P, A	WO 2014/107024 A1 (CELLTRION) 2014.07.10, Claims, Abstract & KR 10-2014-0088828 A & KR 10-2014-0088841 A & KR 10-2014-0088842 A & KR 10-2014-0088843 A	1 - 26

OnCusp
Ex. 1038

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	40724721
Application Number:	17010162
International Application Number:	
Confirmation Number:	6661
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Michael D. Kaminski/Tuan Tran
Filer Authorized By:	Michael D. Kaminski
Attorney Docket Number:	098065-0278
Receipt Date:	01-OCT-2020
Filing Date:	02-SEP-2020
Time Stamp:	11:03:33
Application Type:	Utility under 35 USC 111(a)

Payment information:

Submitted with Payment	no

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Non Patent Literature	B183--FONG_ET_AL____TROP2__a_novel_prognostic_.pdf	833306 3cc09189b12b692699661a4401ec333ac44757f9	no	6

Warnings:

OnCusp
Ex. 1038

Information:					
2	Non Patent Literature	B184--FORNARO_ET_AL____Cloning_of_the_Gene_Enc.pdf	2163618 990a05db90293e6cf58b76c6e0c9346c79fc3efa	no	9
Warnings:					
Information:					
3	Non Patent Literature	B185--FUKUSHIGE_ET_AL____Localization_of_a_Nov.pdf	576322 20cc15b82bb2669fc9eec8ec9c54af744b5d0b4e	no	4
Warnings:					
Information:					
4	Non Patent Literature	B186--Gomez_Monterrey_et_al____Design__Synthes.pdf	135170 e1200460746c6ea676ed5c64f24803e92f6b5b8b	no	1
Warnings:					
Information:					
5	Non Patent Literature	B187--GRAUS_PORTA_ET_AL____ERbB_2__the_preferr.pdf	1733141 1137b7df4c8ba59e9de689499dba59434d52ae91	no	9
Warnings:					
Information:					
6	Non Patent Literature	B188--GRAVALOS_ET_AL____HER2_in_gastric_cancer.pdf	802434 30f5be0ad127526cef3e60501767ea5cf4c15ae3	no	7
Warnings:					
Information:					
7	Non Patent Literature	B189--HARDWICK_ET_AL____Immunohistochemical_de.pdf	615903 5e8b2632723b0ea7ccdb6d1d5196e425540b03b5	no	6
Warnings:					
Information:					
8	Non Patent Literature	B190--HUDIS__M_D___Clifford_A____Trastuzumab__.pdf	3027621 eb59d8ce5bf5d9a3c6074d2ace3f81a6a5a8c2bd	no	13
Warnings:					
Information:					

OnCusp
Ex. 1038

9	Non Patent Literature	B191-- HUDZIAK_ET_AL____Increased_expression_of.pdf	1285087 16512b136657945916fd41a5a94f6aab3c15ec8d	no	5
Warnings:					
Information:					
10	Non Patent Literature	B192-- I__Sullivan__et_al____Osimertinib_in_the.pdf	2008446 04ed32b70ff9c5e0aaf4da9db5ddc71187ca3d54	no	17
Warnings:					
Information:					
11	Non Patent Literature	B193-- IN_Office_Action_issued_in_the_correspon.pdf	512029 4f737632b75e6ba6d6cd31cea692fc4f9514eb51	no	6
Warnings:					
Information:					
12	Non Patent Literature	B194-- INOUE_ET_AL____CM_Dextran_Polyalcohol_Ca.pdf	863058 ecbc0edc63dd45dfdcda60bb492ba88bf9ec8d67	no	9
Warnings:					
Information:					
13	Non Patent Literature	B195-- International_Search_Report_and_Written_.pdf	559306 d1264c2b6d5c39f4f103d0654e444c4ef3f96bba	no	15
Warnings:					
Information:					
14	Non Patent Literature	B196-- International_Search_Report_for_correspo.pdf	795217 1186295523fc9e183c877501958db8641279ee7b	no	11
Warnings:					
Information:					
15	Non Patent Literature	B197-- International_Search_Report_for_PCT_JP20.pdf	330374 9f4f79fe8f0193f6c8a62d928b4f9c6df699fde2	no	8
Warnings:					
Information:					

16	Non Patent Literature	B198--International_Search_Report_for_PCT_JP20.pdf	326659 98a0bcd9e99a0f757ebf00c5431192d7fba93209	no	8
Warnings:					
Information:					
17	Non Patent Literature	B199--International_Search_Report_issued_in_In.pdf	499120 dad9602b27408e0bda76a0688929b3550ec4c7da	no	8
Warnings:					
Information:					
18	Non Patent Literature	B200--Japanese_Notice_Of_Allowance_dated_Octob.pdf	73129 5066397b6ca08b3fa957b8eeb62ae3095d8b0d3b	no	5
Warnings:					
Information:					
19	Non Patent Literature	B201--Japanese_Office_Action_dated_December_6_.pdf	100292 0137abeff79bb27dfe0794c5def2af17ffd82f19	no	4
Warnings:					
Information:					
20	Non Patent Literature	B202--JOTO_ET_AL____DX_8951F__A_Water_Soluble_.pdf	1419340 e51203b3361b4059fd694de2c2056f72e1cf0494	no	7
Warnings:					
Information:					
21	Non Patent Literature	B203--K__Yonesaka__et_al____Anti_HER3_monoclon.pdf	736435 90a6c92f9345da182de99b13fab718f3d3ba1a42	no	10
Warnings:					
Information:					
22	Non Patent Literature	B204--KANG_ET_AL__Engineering_multivalent_anti.pdf	4658682 13207845877c9e0569e953f134e35781cdb95044	no	27
Warnings:					
Information:					

23	Non Patent Literature	B205--KAPTAIN_ET_AL____Her_2_neu_and_Breast_Ca.pdf	1599697 2850c63e731d382143ee5503d81896dc98e9f748	no	14
Warnings:					
Information:					
24	Non Patent Literature	B206--KARUNAGARAN_ET_AL____ErbB_2_is_a_common_.pdf	1841303 e00ca56aeaa5affc2029c4c2997bfe7fc75aab09	no	11
Warnings:					
Information:					
25	Non Patent Literature	B207--KAWAKAMI_ET_AL____The_anti_HER3_antibody.pdf	4814165 8b849c09655313e46eede0d8b2cc7db30b1cfc31	no	10
Warnings:					
Information:					
26	Non Patent Literature	B208--Kimio_Yonesaka___Anti_HER3_Antibody_Patr.pdf	997817 a38eb52e0cbffc59e27681cbfd86bee218bc1308	no	8
Warnings:					
Information:					
27	Non Patent Literature	B209--Korean_Office_Action_dated_May_1__2018_i.pdf	563282 d3a0e5ac77d3d8e03bf80abbec36ecb21c35d02d	no	12
Warnings:					
Information:					
28	Non Patent Literature	B210--KORKAYA_ET_AL____HER2_regulates_the_mamm.pdf	1679277 97f12d04894013afe07e4609543dbc505148918e	no	11
Warnings:					
Information:					
29	Non Patent Literature	B211--KRAUS_ET_AL____Demonstration_of_ligand_d.pdf	1031262 58bb78568391f72136dff331952b859d01c7c665	no	5
Warnings:					
Information:					

30	Non Patent Literature	B212--KRAUS_ET_AL____Isolation_and_characteriz.pdf	1057616 89cc92128daceca6b620fc40f1b4b09fb0e6da8d	no	5
Warnings:					
Information:					
31	Non Patent Literature	B213--KUMAZAWA_ET_AL____Antitumor_activity_of_.pdf	1702322 90445af36906579b7eb52d2a1a05792b60e69312	no	8
Warnings:					
Information:					
32	Non Patent Literature	B214--KUMAZAWA_ET_AL____DE_310__a_novel_macrom.pdf	1572163 93437c0a01e9218aa7344fbe525cd7532b9a79e1	no	8
Warnings:					
Information:					
33	Non Patent Literature	B215--KUMAZAWA_ET_AL____Potent_and_broad_antit.pdf	1782116 f1b6b8ba96a97b19b35f4e3ce6fcf0a54d387840	no	11
Warnings:					
Information:					
34	Non Patent Literature	B216--LINNENBACH_ET_AL____Sequence_investigati.pdf	1352913 39783894bd40fe64baa0a99552be6153bdeeaab0	no	5
Warnings:					
Information:					
35	Non Patent Literature	B217--LIPINSKI_ET_AL____Human_trophoblast_cell.pdf	1095635 1710d3a66a9839e4a033be905e99a64f55916abf	no	4
Warnings:					
Information:					
36	Non Patent Literature	B218--McDonagh_et_al____Engineered_antibody_dr.pdf	1419318 f0421f627cdc7576660a4916e4953999dcf96241	no	9
Warnings:					
Information:					

37	Non Patent Literature	B219--MITSUI_ET_AL____A_New_Water_soluble_Camp.pdf	1291440 9f033bf915278f843adc1417fdbf8c8dbe01c353	no	7
Warnings:					
Information:					
38	Non Patent Literature	B220--Moghaddas_et_al____Whether_HER2_positive.pdf	628627 d4954871db53f819741c9f11fcc0b426e53d488f	no	11
Warnings:					
Information:					
39	Non Patent Literature	B221--M_HLMANN_ET_AL____TROP2_expression_as_pr.pdf	857442 721fe7f2628153b82e14d879adae5bf1658918b3	no	7
Warnings:					
Information:					
40	Non Patent Literature	B222--N__MASABUCHI___Pharmacokinetics_of_DE_31.pdf	372217 f8a6325d9b9750e7087e4dbda57e5b2dd9af3839	no	4
Warnings:					
Information:					
41	Non Patent Literature	B223--N_V__Sergina__et_al___Escape_from_HER_fa.pdf	520757 63db5e31f80aeeb4825e099a354b8c8da328f2ac	no	6
Warnings:					
Information:					
42	Non Patent Literature	B224--NAIDU_ET_AL____Expression_of_c_erbB3_pro.pdf	1230138 312321d75eea433ac7f5e82d054e400fdf51c845	no	6
Warnings:					
Information:					
43	Non Patent Literature	B225--NAKADA_ET_AL____Novel_antibody_drug_conj.pdf	498572 55792303019338b1409bbbe8a5b88447a7bf7fa0	no	4
Warnings:					
Information:					

44	Non Patent Literature	B226--NING_ET_AL____TROP2_expression_and_its_c.pdf	693659 6ad6e413579b39aea637a6b29cdc4bf25a6644f9	no	6
Warnings:					
Information:					
45	Non Patent Literature	B227--Non_Final_Office_Action_issued_in_U_S__P.pdf	378759 33830bad5621fc4dccc3af96c12940ae784953aa	no	10
Warnings:					
Information:					
46	Non Patent Literature	B228--Non_Final_Office_Action_issued_in_U_S__P.pdf	406869 94ecc31d908adba54f73080eb3446de03d69a112	no	11
Warnings:					
Information:					
47	Non Patent Literature	B229--Non_Final_Office_Action_issued_in_U_S__P.pdf	372484 9421d68c4144b3a27e9728cf9a9a893f0c53e628	no	10
Warnings:					
Information:					
48	Non Patent Literature	B230--Non_Final_Office_Action_issued_in_U_S__P.pdf	745751 c05ad38c12e3d3479ab864df63eb957e8f10a671	no	31
Warnings:					
Information:					
49	Non Patent Literature	B231--Non_Final_Office_Action_issued_in_U_S__P.pdf	272521 0603d5056801c52cbfcf0d3a451fd154a97caf76	no	10
Warnings:					
Information:					
50	Non Patent Literature	B232--Notice_of_Allowance_issued_in_U_S__Paten.pdf	351575 d46bed48ce1a0639420553161799b88b785fd9dc	no	5
Warnings:					
Information:					

OnCusp
Ex. 1038

51	Non Patent Literature	B233--Notice_of_Allowance_on_US_15_821662_DTD_.pdf	351884 9566c75921d0d78406a964d50ad675d4731f9e2f	no	5
Warnings:					
Information:					
52	Non Patent Literature	B234--OCHI_et_al___A_possible_mechanism_for_th.pdf	1821800 d41ef1906e6d7347d31ac711415ed3a9812da881	no	10
Warnings:					
Information:					
53	Non Patent Literature	B235--Office_Action_dated_November_21__2017_in.pdf	855238 9c62f64d09ff40da1551f6e8eb578052968ee56f	no	11
Warnings:					
Information:					
54	Non Patent Literature	B236--Office_Action_issued_April_22__2016__in_.pdf	359593 a32ed4c637115e5ceb4da69eb546c5040d832311	no	12
Warnings:					
Information:					
55	Non Patent Literature	B237--Office_Action_issued_in_Colombian_Applic.pdf	7574455 2f3abcb246e9fbabc1c57341f968fe1d31f791d7	no	16
Warnings:					
Information:					
56	Non Patent Literature	B238--Office_Action_issued_in_US_Application_N.pdf	374528 0ad63a8b264f5618a6175208d6a6299bf0226bdb	no	10
Warnings:					
Information:					
57	Non Patent Literature	B239--Office_Action_with_Search_Report_dated_A.pdf	363670 7b8a8dbe3e429c9958837a0e040b7c6663b10d24	no	8
Warnings:					
Information:					

OnCusp
Ex. 1038

58	Non Patent Literature	B240--OGITANI_et_al____Bystander_killing_effec.pdf	1140972 0c32fc91b85335bd3c50d265d6724a64863ac202	no	8
Warnings:					
Information:					
59	Non Patent Literature	B241--OGITANI_et_al____DS_8201a__A_Novel_HER2_.pdf	1317417 920485218 44e73dbd34a6d09e4051afb19c11330	no	13
Warnings:					
Information:					
60	Non Patent Literature	B242--OGITANI_et_al____Wide_application_of_a_n.pdf	354458 81a59dc6f4bc42e034e2f2072578662ecdb55070	no	4
Warnings:					
Information:					
			Total Files Size (in bytes):	69698401	

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111

If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371

If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office

If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 December 2008 (04.12.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/144891 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 16/30 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/46* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61K 51/10 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *G01N 33/577* (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/CA2008/000979

(22) International Filing Date: 23 May 2008 (23.05.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
11/807,837 30 May 2007 (30.05.2007) US

(71) Applicant: **ARIUS RESEARCH INC.** [CA/CA]; 55 York Street, 15th Floor, Toronto, Ontario M5J 1R7 (CA).

(72) Inventors: **YOUNG, David, S., F.**; 33 University Avenue, Suite 2407, Toronto, Ontario M5J 2S7 (CA). **FINDLAY, Helen P.**; 205 Glendonwynne Road, Toronto, Ontario M6P 3E9 (CA). **HAHN, Susan, E.**; 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3N7 (CA). **DA CRUZ, Luis, A., G.**; 9 Innisfree Court, Toronto, Ontario M6S 3N7 (CA). **FERRY, Alison, L.**; 143 Grenadier Crescent, Thomhill, Ontario L4J 7V6 (CA).

(74) Agent: **SINGLEHURST, John, C.**; Finlayson & Singlehurst, 70 Gloucester Street, Ottawa, ON K2P 0A2 (CA).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

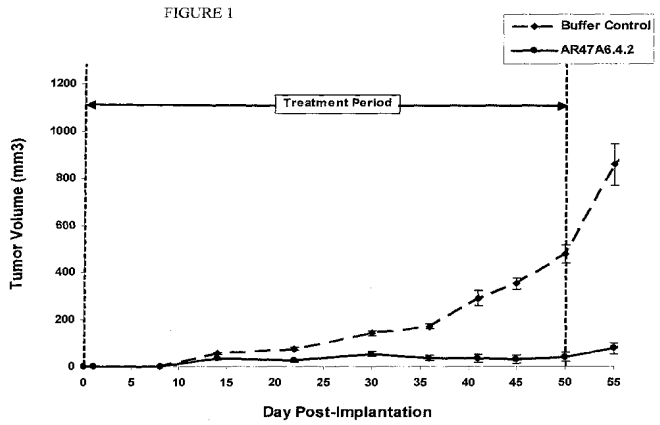
(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:
— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

[Continued on next page]

(54) Title: HUMANIZED AND CHIMERIC ANTI-TROP-2 ANTIBODIES THAT MEDIATE CANCER CELL CYTOTOXICITY

FIGURE 1



(57) Abstract: Expression of TROP-2, an approximately 35 kDa transmembrane protein and a substrate of protein kinase C, has been linked to several cancers. TROP-2 is also known as GA733-1, epithelial glycoprotein 1 (EGP-I) and tumor-associated calcium signal transducer-2. A monoclonal antibody against TROP-2 from the hybridoma AR47A6.4.2, deposited with the International Depository Authority of Canada (IDAC) as accession number 141205-05, was previously shown to be a cancerous disease modifying antibody (CDMAB), preventing tumour growth and reducing tumour burden in several cancer models including prostate, pancreatic and breast cancer by cytotoxicity. The variable regions of this monoclonal antibody were also isolated, sequenced and complementarity determining regions (CDRs) determined. Now, a chimeric antibody and humanized antibodies are generated that have similar TROP-2 binding activity as the parent 141205-05 monoclonal antibody. The monoclonal, chimeric and humanized antibodies can be conjugated to toxins, enzymes, radioactive compounds, cytokines, interferons, target or reporter moieties and hematogenous cells to treat cancer. These antibodies are also used in binding assays to determine TROP-2 expression on cells.

WO 2008/144891 A1

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *with international search report*

— *with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau*

FIELD OF THE INVENTION

This invention relates to the diagnosis and treatment of cancerous diseases, particularly to the mediation of cytotoxicity of tumor cells; and most particularly to the use of cancerous disease modifying antibodies (CDMAB), optionally in combination with one or more CDMAB/chemotherapeutic agents, as a means for initiating the cytotoxic response. The invention further relates to binding assays, which utilize the CDMAB of the instant invention.

BACKGROUND OF THE INVENTION

TROP-2 is a cell surface glycoprotein expressed on most carcinomas, as well as some normal human tissues. It was initially defined as a molecule recognized by two murine monoclonal antibodies raised to a human choriocarcinoma cell line BeWo that recognized an antigen on human trophoblast cells (Faulk 1978). The same molecule was independently discovered by other investigators which led to multiple names describing the same antigen. Hence, TROP-2 was also referred to as GA733-1 and epithelial glycoprotein-1 (EGP-1) (Basu 1995, Fornaro 1995).

The TROP-*2* gene is an intronless gene that was thought to have been formed through the retroposition of a homologous gene *GA733-2* (also known as *epithelial glycoprotein-2*, *EpCAM and Trop-1*) via an RNA intermediate. The *TROP-2* gene has been mapped to chromosome 1p32 (Calabrese 2001). The protein component of TROP-2 has a molecular mass of approximately 35 kilodaltons. Its mass may be increased by 11-13 kilodaltons with heterogeneous N-linked glycosylation of its extracellular domain. There are many cysteine residues in the extracellular domain which could form disulfide bridge sites. TROP-2 is a substrate for protein kinase C, a Ca^{2+} dependent protein kinase and the intracellular serine 303 residue has been shown to be phosphorylated (Basu 1995). It has also been shown that crossing-linking of TROP-2 with anti-TROP-2 antibodies transduced a calcium signal as shown by a rise in cytoplasmic Ca^{2+} (Ripani 1998). These data support signal transduction as a physiological function of TROP-2, although to date no physiological ligand has been identified. An association between TROP-2 expression and cancer has been shown in a report in which *TROP-2* was identified as a member of a group of genes reported

to be the most highly overexpressed in ovarian serous papillary carcinoma compared to normal ovarian epithelium in a large-scale gene expression analysis using cDNA microarray technology (Santin 2004). A recent study, analyzing 74 colorectal human cancer samples by quantitative real-time RT-PCR and 34 of the samples by immunohistochemistry, examined TROP-2 expression levels in cancer and normal patient sections. TROP-2 was found to be more highly expressed in cancer versus normal patient samples, and the study further demonstrated a correlation between TROP-2 expression levels and biological aggressiveness. High levels of TROP-2 were found to be associated with poor prognosis, a decrease in patient survival and an increase in the frequency of liver metastases (Ohmachi 2006), suggesting that TROP-2 may be useful as a prognostic indicator and may be an attractive therapeutic target.

The expression profile of TROP-2 has been elucidated through immunohistochemistry (IHC) and flow cytometry studies using many different TROP-2 antibodies. Anti-TROP-2 antibodies 162-25.3 and 162-46.2 were produced through immunization of mice with the human choriocarcinoma cell line BeWo, and were investigated for their reactivity to a series of tumor and lymphoid cell lines and peripheral blood mononuclear cells. In this study both antibodies appeared to be trophoblast specific, staining 3 of the 4 choriocarcinoma cell lines tested, while none of the other lymphoid or tumor cell lines (representing fibrosarcoma, cervical sarcoma, colon carcinoma, melanoma, neuroblastoma, erythroleukemia) were stained in an indirect immunofluorescence FACS assay. In addition, none of the normal peripheral blood cells were stained. The antibodies were tested for staining of formalin-fixed paraffin-embedded placenta tissue sections and frozen normal sections of liver, kidney, spleen, thymus and lymph node tissues. The placenta tissue sections were stained with both antibodies, while there was no staining of the other normal tissues (Lipinski 1981). These two antibodies have strictly been reported for use in *in vitro* diagnostic studies.

Anti-TROP-2 antibody MOv16 was generated through the immunization of mice with a crude membrane preparation of poorly differentiated ovarian carcinoma OvCa4343/83. MOv16 was tested for reactivity to a series of frozen tissue sections of benign and malignant ovarian tumors. MOv16 reacted with 31 of 54 malignant ovarian tumors and 2 of 16 benign ovarian tumors. Of the 5 mucinous ovarian tumors that were tested, MOv16 was completely unreactive. MOv16 was also tested for reactivity to frozen sections of non-

ovarian malignant tumors where it was found to bind 117 of 189 breast carcinoma sections and 12 of 18 lung carcinoma sections. MOv16 was completely unreactive on 16 non-epithelial tumors that were tested (including liposarcomas, chondrosarcomas, endotheliomas, histiocytomas and dysgerminomas). When tested on frozen normal tissue sections, MOv-16 was reactive with breast, pancreas, kidney and prostate sections. MOv16 reactivity was reported to be negative on lung, spleen, skin, ovary, thyroid, parotid gland, stomach, larynx, uterus and colon sections, though the number of tissue sections that were used was not reported. The authors noted that frozen tissue sections were used because MOv16 was unreactive to paraffin embedded tissues (Miotti 1987). This antibody has also only been reported for use in *in vitro* diagnositic studies.

Anti-TROP-2 antibody Rs7-3G11 (RS7) was generated through the immunization of mice with a crude membrane preparation derived from a surgically removed human primary squamous cell carcinoma of the lung. IHC was used to examine the staining of RS7 on frozen sections of human tumor and normal tissues. RS7 bound to 33 of the 40 sections representing tumors of the breast, colon, kidney, lung, prostate and squamous cell cancer. Of the normal tissues RS7 bound to 16 of 20 sections of breast, colon, kidney, liver, lung and prostate tissues while none of the five sections of spleen tissue were stained. In this study the authors noted that it appeared that antigen density in tumors was higher than in normal epithelial tissues (Stein 1990).

Additional studies of the tissue specificity of RS7 were carried out on both tumor and normal tissues. RS7 was tested on a panel of frozen tumor sections and bound to 65 of the 77 sections representing tumors of the lung, stomach, kidney, bladder, colon, breast, ovary, uterus and prostate. There was no binding to the 5 lymphomas tested. RS7 was tested on a panel of 85 frozen human normal tissue sections composed of a total of 24 tissue types. 39 sections of 13 normal tissues (lung, bronchus, trachea, esophagus, colon, liver, pancreas, kidney, bladder, skin, thyroid, breast and prostate) were stained by RS7. The authors of this study noted that in the tissues in which positive staining was observed, the reactivity was generally restricted to epithelial cells, primarily in ducts or glands. It was also noted that this study was limited to frozen sections since it was observed that RS7 was not reactive on formalin-fixed paraffin-embedded sections (Stein 1993).

Polyclonal anti-TROP-2 antibodies were prepared by immunizing mice with a synthetic peptide corresponding to amino acid positions between 169 and 182 of the cytoplasmic domain of human TROP-2. The polyclonal antibodies were tested on a tissue array slide that contained formalin-fixed human esophageal hyperplasia and carcinoma tissues. Ten of the 55 carcinoma specimens displayed heavy staining with the polyclonal antibodies, while the mild hyperplasia tissue stained very weakly, indicating expression levels may be related to malignant transformation (Nakashima 2004).

Overall, IHC reactivity patterns obtained with different anti-TROP-2 antibodies were consistent. Expression in cancer was seen primarily in carcinomas, and most carcinomas were reactive. In normal tissues, expression appeared to be limited to cells of epithelial origin, and there was some evidence that staining of carcinomas was stronger than staining of corresponding normal epithelial tissues.

In addition to being used in IHC studies, antibody RS7 was tested in *in vivo* models with initial experiments consisting of tumor targeting studies in nude mouse xenograft models. Radiolabeled RS7 injected *i.v.* was shown to accumulate specifically in the tumor of mice bearing either Calu-3 (lung adenocarcinoma) or GW-39 (colon carcinoma) tumors (Stein 1990). Further studies were done to investigate the biodistribution of radiolabeled RS7 in a xenograft system and to study the therapeutic potential of RS7 as an immunoconjugate. In this study the therapeutic efficacy of ^{131}I-labeled RS7 F(ab')$_2$ was investigated in nude mice bearing Calu-3 human lung adenocarcinoma xenografts. Three weeks following inoculation of the mice with Calu-3 cells, when the tumors had reached a size of approximately 0.3-0.9 grams, groups of 6-7 mice were treated with a single dose *i.v.* of either 1.0 mCi ^{131}I-RS7-F(ab')$_2$ or 1.5 mCi ^{131}I-RS7-F(ab')$_2$ and compared to a similar group of untreated control mice. The single dose of 1.0 mCi ^{131}I-RS7-F(ab')$_2$ resulted in tumor growth suppression for approximately 5 weeks, while the single dose of 1.5 mCi ^{131}I-RS7-F(ab')$_2$ resulted in tumor regression, and the mean tumor size did not exceed the pre-therapy size until the eighth week after radioantibody injection. Mice receiving the 1.5 mCi ^{131}I-RS7-F(ab')$_2$ dose experienced a mean body weight loss of 18.7 percent, indicating there was toxicity associated with the treatment. In this study, effects of treatment with naked RS7 or the F(ab')$_2$ fragment of RS7 were not tested (Stein 1994a). Another study was done to test the efficacy of ^{131}I-RS7 in a MDA-MB-468 breast cancer xenograft model. Groups of ten mice bearing MDA-MB-468

tumors of approximately 0.1 cm^3 were treated with a single dose *i.v.* of either 250 microcuries ^{131}I-RS7 or 250 microcuries ^{131}I-Ag8 (an isotype matched control antibody). Groups of six mice were treated with a single dose *i.v.* of 30 micrograms of either unlabeled RS7 or Ag8. Complete regression of the tumors (except for one animal that had a transient reappearance of tumor) was seen in the animals treated with ^{131}I-RS7, which lasted for the duration of the 11 week observation period. Tumor regression was also seen in ^{131}I-Ag8 treated mice, though was only observed between 2 weeks and 5 weeks with tumors either persisting or continuing to grow for the remainder of the study. Tumor growth of mice that received unlabeled RS7 or Ag8 was not inhibited and there did not appear to be any differences in the mean tumor volume of RS7 treated mice compared to the Ag8 treated mice. Two additional groups of 10 mice bearing larger MDA-MB-468 tumors of approximately 0.2-0.3 cm^3 were treated with a slightly higher single dose of either 275 microcuries ^{131}I-Rs7 or 275 microcuries ^{131}Ag8 and compared to a similar group of untreated mice. Tumor volume was measured weekly for 15 weeks. Although in this case there was a significant difference in tumor growth between the ^{131}I-RS7 treated mice compared to the untreated mice, there was no significant difference in the tumor growth of the ^{131}I-RS7 compared to the ^{131}I-Ag8 treated mice, indicating a portion of the efficacy may have been due to non-specific effects of the radiation. Unlabeled antibodies were not tested in mice containing 0.2-0.3 cm^3 tumors (Shih 1995).

There have been numerous additional studies examining the efficacy of RS7 as an immunoconjugate with an attempt to select the optimal radiolabel for radioimmunotherapy (Stein 2001a, Stein 2001b, Stein 2003). A humanized version of RS7 has also been generated; however it has only been tested in preclinical xenograft models as a radioconjugate (Govindan 2004). These studies show similar positive effects as the previously described studies with RS7, however in one study, even when radiolabeled RS7 was delivered at a previously determined maximum tolerable dose, toxicity occurred leading to death in some mice (Stein 2001a). Although effective treatment of xenograft tumors in mice was achieved with radiolabeled RS7 in these studies, naked RS7 was not evaluated.

Immunizing mice with neuraminidase pre-treated H3922 human breast carcinoma cells produced the anti-TROP-2 monoclonal antibody BR110 (as disclosed in US patent No. 5,840,854, refer to Prior Patents section). By immunohistology, using human frozen tissue specimens, BR110 was shown to react with a wide range of human carcinoma

specimens including those of the lung, colon, breast, ovarian, kidney, esophagus, pancreas, skin, lung and tonsil. No human normal tissue sections were tested. *In vitro* studies demonstrated that BR110 had no ADCC or CDC activity on the human carcinoma cell lines H3396 or H3922. *In vitro* studies analyzing the cytotoxicity of BR110-immunotoxins was performed on the human cancer cell lines H3619, H2987, MCF-7, H3396 and H2981. The EC_{50} for the cell lines tested was 0.06, 0.001, 0.05, 0.09 and >5 micrograms/mL respectively. No cytotoxicity data was disclosed for the naked BR110 antibody. No *in vivo* data was disclosed for the naked or immunoconjugated BR110.

A number of additional antibodies have been generated that target TROP-2, such as MR54, MR6 and MR23 which were generated from immunization of mice with the ovarian cancer cell line Colo 316 (Stein 1994b) and antibody T16 which was generated by immunization of mice with the T24 bladder cancer cell line (Fradet 1984). The use of these antibodies has been limited to biochemical characterization of the TROP-2 antigen and cell line and tissue expression studies. There have been no reports of anti-cancer efficacy of these antibodies, either *in vitro* or *in vivo*. RS7 was the only antibody that was tested for therapeutic efficacy in preclinical cancer models, with its use being limited to a carrier of radioisotope. There are no reports of any naked TROP-2 antibodies exhibiting therapeutic efficacy in clinical studies or in preclinical cancer models either *in vitro* or *in vivo*.

Monoclonal Antibodies as Cancer Therapy: Each individual who presents with cancer is unique and has a cancer that is as different from other cancers as that person's identity. Despite this, current therapy treats all patients with the same type of cancer, at the same stage, in the same way. At least 30 percent of these patients will fail the first line therapy, thus leading to further rounds of treatment and the increased probability of treatment failure, metastases, and ultimately, death. A superior approach to treatment would be the customization of therapy for the particular individual. The only current therapy which lends itself to customization is surgery. Chemotherapy and radiation treatment cannot be tailored to the patient, and surgery by itself, in most cases is inadequate for producing cures.

With the advent of monoclonal antibodies, the possibility of developing methods for customized therapy became more realistic since each antibody can be directed to a single epitope. Furthermore, it is possible to produce a combination of antibodies that are directed to the constellation of epitopes that uniquely define a particular individual's tumor.

Having recognized that a significant difference between cancerous and normal cells is that cancerous cells contain antigens that are specific to transformed cells, the scientific community has long held that monoclonal antibodies can be designed to specifically target transformed cells by binding specifically to these cancer antigens; thus giving rise to the belief that monoclonal antibodies can serve as "Magic Bullets" to eliminate cancer cells. However, it is now widely recognized that no single monoclonal antibody can serve in all instances of cancer, and that monoclonal antibodies can be deployed, as a class, as targeted cancer treatments. Monoclonal antibodies isolated in accordance with the teachings of the instantly disclosed invention have been shown to modify the cancerous disease process in a manner which is beneficial to the patient, for example by reducing the tumor burden, and will variously be referred to herein as cancerous disease modifying antibodies (CDMAB) or "anti-cancer" antibodies.

At the present time, the cancer patient usually has few options of treatment. The regimented approach to cancer therapy has produced improvements in global survival and morbidity rates. However, to the particular individual, these improved statistics do not necessarily correlate with an improvement in their personal situation.

Thus, if a methodology was put forth which enabled the practitioner to treat each tumor independently of other patients in the same cohort, this would permit the unique approach of tailoring therapy to just that one person. Such a course of therapy would, ideally, increase the rate of cures, and produce better outcomes, thereby satisfying a long-felt need.

Historically, the use of polyclonal antibodies has been used with limited success in the treatment of human cancers. Lymphomas and leukemias have been treated with human plasma, but there were few prolonged remission or responses. Furthermore, there was a lack of reproducibility and there was no additional benefit compared to chemotherapy. Solid tumors such as breast cancers, melanomas and renal cell carcinomas have also been treated with human blood, chimpanzee serum, human plasma and horse serum with correspondingly unpredictable and ineffective results.

There have been many clinical trials of monoclonal antibodies for solid tumors. In the 1980s there were at least four clinical trials for human breast cancer which produced only one responder from at least 47 patients using antibodies against specific antigens or based on tissue selectivity. It was not until 1998 that there was a successful

clinical trial using a humanized anti-Her2/neu antibody (Herceptin®) in combination with CISPLATIN. In this trial 37 patients were assessed for responses of which about a quarter had a partial response rate and an additional quarter had minor or stable disease progression. The median time to progression among the responders was 8.4 months with median response duration of 5.3 months.

Herceptin® was approved in 1998 for first line use in combination with Taxol®. Clinical study results showed an increase in the median time to disease progression for those who received antibody therapy plus Taxol® (6.9 months) in comparison to the group that received Taxol® alone (3.0 months). There was also a slight increase in median survival; 22 versus 18 months for the Herceptin® plus Taxol® treatment arm versus the Taxol® treatment alone arm. In addition, there was an increase in the number of both complete (8 versus 2 percent) and partial responders (34 versus 15 percent) in the antibody plus Taxol® combination group in comparison to Taxol® alone. However, treatment with Herceptin® and Taxol® led to a higher incidence of cardiotoxicity in comparison to Taxol® treatment alone (13 versus 1 percent respectively). Also, Herceptin® therapy was only effective for patients who over express (as determined through immunohistochemistry (IHC) analysis) the human epidermal growth factor receptor 2 (Her2/neu), a receptor, which currently has no known function or biologically important ligand; approximately 25 percent of patients who have metastatic breast cancer. Therefore, there is still a large unmet need for patients with breast cancer. Even those who can benefit from Herceptin® treatment would still require chemotherapy and consequently would still have to deal with, at least to some degree, the side effects of this kind of treatment.

The clinical trials investigating colorectal cancer involve antibodies against both glycoprotein and glycolipid targets. Antibodies such as 17-1A, which has some specificity for adenocarcinomas, has undergone Phase 2 clinical trials in over 60 patients with only 1 patient having a partial response. In other trials, use of 17-1A produced only 1 complete response and 2 minor responses among 52 patients in protocols using additional cyclophosphamide. To date, Phase III clinical trials of 17-1A have not demonstrated improved efficacy as adjuvant therapy for stage III colon cancer. The use of a humanized murine monoclonal antibody initially approved for imaging also did not produce tumor regression.

Only recently have there been any positive results from colorectal cancer clinical studies with the use of monoclonal antibodies. In 2004, ERBITUX® was approved for the second line treatment of patients with EGFR-expressing metastatic colorectal cancer who are refractory to irinotecan-based chemotherapy. Results from both a two-arm Phase II clinical study and a single arm study showed that ERBITUX® in combination with irinotecan had a response rate of 23 and 15 percent respectively with a median time to disease progression of 4.1 and 6.5 months respectively. Results from the same two-arm Phase II clinical study and another single arm study showed that treatment with ERBITUX® alone resulted in an 11 and 9 percent response rate respectively with a median time to disease progression of 1.5 and 4.2 months respectively.

Consequently in both Switzerland and the United States, ERBITUX® treatment in combination with irinotecan, and in the United States, ERBITUX® treatment alone, has been approved as a second line treatment of colon cancer patients who have failed first line irinotecan therapy. Therefore, like Herceptin®, treatment in Switzerland is only approved as a combination of monoclonal antibody and chemotherapy. In addition, treatment in both Switzerland and the US is only approved for patients as a second line therapy. Also, in 2004, AVASTIN® was approved for use in combination with intravenous 5-fluorouracil-based chemotherapy as a first line treatment of metastatic colorectal cancer. Phase III clinical study results demonstrated a prolongation in the median survival of patients treated with AVASTIN® plus 5-fluorouracil compared to patients treated with 5-fluourouracil alone (20 months versus 16 months respectively). However, again like Herceptin® and ERBITUX®, treatment is only approved as a combination of monoclonal antibody and chemotherapy.

There also continues to be poor results for lung, brain, ovarian, pancreatic, prostate, and stomach cancer. The most promising recent results for non-small cell lung cancer came from a Phase II clinical trial where treatment involved a monoclonal antibody (SGN-15; dox-BR96, anti-Sialyl-LeX) conjugated to the cell-killing drug doxorubicin in combination with the chemotherapeutic agent TAXOTERE®. TAXOTERE® is the only FDA approved chemotherapy for the second line treatment of lung cancer. Initial data indicate an improved overall survival compared to TAXOTERE® alone. Out of the 62 patients who were recruited for the study, two-thirds received SGN-15 in combination with TAXOTERE® while the remaining one-third received TAXOTERE® alone. For the patients receiving SGN-

15 in combination with TAXOTERE®, median overall survival was 7.3 months in comparison to 5.9 months for patients receiving TAXOTERE® alone. Overall survival at 1 year and 18 months was 29 and 18 percent respectively for patients receiving SNG-15 plus TAXOTERE® compared to 24 and 8 percent respectively for patients receiving TAXOTERE® alone. Further clinical trials are planned.

Preclinically, there has been some limited success in the use of monoclonal antibodies for melanoma. Very few of these antibodies have reached clinical trials and to date none have been approved or demonstrated favorable results in Phase III clinical trials.

The discovery of new drugs to treat disease is hindered by the lack of identification of relevant targets among the products of 30,000 known genes that could contribute to disease pathogenesis. In oncology research, potential drug targets are often selected simply due to the fact that they are over-expressed in tumor cells. Targets thus identified are then screened for interaction with a multitude of compounds. In the case of potential antibody therapies, these candidate compounds are usually derived from traditional methods of monoclonal antibody generation according to the fundamental principles laid down by Kohler and Milstein (1975, Nature, 256, 495-497, Kohler and Milstein). Spleen cells are collected from mice immunized with antigen (e.g. whole cells, cell fractions, purified antigen) and fused with immortalized hybridoma partners. The resulting hybridomas are screened and selected for secretion of antibodies which bind most avidly to the target. Many therapeutic and diagnostic antibodies directed against cancer cells, including Herceptin® and RITUXIMAB, have been produced using these methods and selected on the basis of their affinity. The flaws in this strategy are two-fold. Firstly, the choice of appropriate targets for therapeutic or diagnostic antibody binding is limited by the paucity of knowledge surrounding tissue specific carcinogenic processes and the resulting simplistic methods, such as selection by overexpression, by which these targets are identified. Secondly, the assumption that the drug molecule that binds to the receptor with the greatest affinity usually has the highest probability for initiating or inhibiting a signal may not always be the case.

Despite some progress with the treatment of breast and colon cancer, the identification and development of efficacious antibody therapies, either as single agents or co-treatments, have been inadequate for all types of cancer.

Prior Patents:

U.S. Patent No. 5,750,102 discloses a process wherein cells from a patient's tumor are transfected with MHC genes which may be cloned from cells or tissue from the patient. These transfected cells are then used to vaccinate the patient.

U.S. Patent No. 4,861,581 discloses a process comprising the steps of obtaining monoclonal antibodies that are specific to an internal cellular component of neoplastic and normal cells of the mammal but not to external components, labeling the monoclonal antibody, contacting the labeled antibody with tissue of a mammal that has received therapy to kill neoplastic cells, and determining the effectiveness of therapy by measuring the binding of the labeled antibody to the internal cellular component of the degenerating neoplastic cells. In preparing antibodies directed to human intracellular antigens, the patentee recognizes that malignant cells represent a convenient source of such antigens.

U.S. Patent No. 5,171,665 provides a novel antibody and method for its production. Specifically, the patent teaches formation of a monoclonal antibody which has the property of binding strongly to a protein antigen associated with human tumors, e.g. those of the colon and lung, while binding to normal cells to a much lesser degree.

U.S. Patent No. 5,484,596 provides a method of cancer therapy comprising surgically removing tumor tissue from a human cancer patient, treating the tumor tissue to obtain tumor cells, irradiating the tumor cells to be viable but non-tumorigenic, and using these cells to prepare a vaccine for the patient capable of inhibiting recurrence of the primary tumor while simultaneously inhibiting metastases. The patent teaches the development of monoclonal antibodies which are reactive with surface antigens of tumor cells. As set forth at col. 4, lines 45 et seq., the patentees utilize autochthonous tumor cells in the development of monoclonal antibodies expressing active specific immunotherapy in human neoplasia.

U.S. Patent No. 5,693,763 teaches a glycoprotein antigen characteristic of human carcinomas and not dependent upon the epithelial tissue of origin.

U.S. Patent No. 5,783,186 is drawn to Anti-Her2 antibodies which induce apoptosis in Her2 expressing cells, hybridoma cell lines producing the antibodies, methods of treating cancer using the antibodies and pharmaceutical compositions including said antibodies.

U.S. Patent No. 5,849,876 describes new hybridoma cell lines for the production of monoclonal antibodies to mucin antigens purified from tumor and non-tumor tissue sources.

U.S. Patent No. 5,869,268 is drawn to a method for generating a human lymphocyte producing an antibody specific to a desired antigen, a method for producing a monoclonal antibody, as well as monoclonal antibodies produced by the method. The patent is particularly drawn to the production of an anti-HD human monoclonal antibody useful for the diagnosis and treatment of cancers.

U.S. Patent No. 5,869,045 relates to antibodies, antibody fragments, antibody conjugates and single-chain immunotoxins reactive with human carcinoma cells. The mechanism by which these antibodies function is two-fold, in that the molecules are reactive with cell membrane antigens present on the surface of human carcinomas, and further in that the antibodies have the ability to internalize within the carcinoma cells, subsequent to binding, making them especially useful for forming antibody-drug and antibody-toxin conjugates. In their unmodified form the antibodies also manifest cytotoxic properties at specific concentrations.

U.S. Patent No. 5,780,033 discloses the use of autoantibodies for tumor therapy and prophylaxis. However, this antibody is an antinuclear autoantibody from an aged mammal. In this case, the autoantibody is said to be one type of natural antibody found in the immune system. Because the autoantibody comes from "an aged mammal", there is no requirement that the autoantibody actually comes from the patient being treated. In addition the patent discloses natural and monoclonal antinuclear autoantibody from an aged mammal, and a hybridoma cell line producing a monoclonal antinuclear autoantibody.

U.S. Patent No. 5,840,854 discloses a specific antibody, BR110 directed against GA733-1. This patent discloses *in vitro* function for BR110 as an immunotoxin conjugate. There was no *in vitro* function as a naked antibody disclosed for this antibody. There was also no *in vivo* function disclosed for this antibody.

U.S. Patent No. 6,653,104 claims immunotoxin-conjugated antibodies, including but not limited to RS7, directed against a host of antigens, including but not limited to EGP-1. The immunotoxin is limited to those possessing ribonucleolytic activity. However,

the examples disclose only a specific immunotoxin-conjugated antibody, LL2, directed against CD22. There was no *in vitro* or *in vivo* function for RS7 disclosed in this application.

U.S. Application No. 20040001825A1 discloses a specific antibody, RS7 directed against EGP-1. This application discloses *in vitro* function for RS7 as a radiolabeled conjugate. There was no *in vitro* function as a naked antibody disclosed for this antibody. This application also discloses *in vivo* function for RS7 resulting from radiolabled and unlabeled conjugate administered sequentially. However, this study was limited to one patient and it is unknown whether any of the observed function was due to the unlabeled antibody. There was no *in vivo* function for RS7 resulting from the administration of the naked antibody.

SUMMARY OF THE INVENTION

This application utilizes methodology for producing patient specific anti-cancer antibodies taught in the U.S. 6,180,357 patent for isolating hybridoma cell lines which encode for cancerous disease modifying monoclonal antibodies. These antibodies can be made specifically for one tumor and thus make possible the customization of cancer therapy. Within the context of this application, anti-cancer antibodies having either cell-killing (cytotoxic) or cell-growth inhibiting (cytostatic) properties will hereafter be referred to as cytotoxic. These antibodies can be used in aid of staging and diagnosis of a cancer, and can be used to treat tumor metastases. These antibodies can also be used for the prevention of cancer by way of prophylactic treatment. Unlike antibodies generated according to traditional drug discovery paradigms, antibodies generated in this way may target molecules and pathways not previously shown to be integral to the growth and/or survival of malignant tissue. Furthermore, the binding affinities of these antibodies are suited to requirements for initiation of the cytotoxic events that may not be amenable to stronger affinity interactions. Also, it is within the purview of this invention to conjugate standard chemotherapeutic modalities, e.g. radionuclides, with the CDMAB of the instant invention, thereby focusing the use of said chemotherapeutics. The CDMAB can also be conjugated to toxins, cytotoxic moieties, enzymes e.g. biotin conjugated enzymes, cytokines, interferons, target or reporter moieties or hematogenous cells, thereby forming an antibody conjugate. The CDMAB can be used alone or in combination with one or more CDMAB/chemotherapeutic agents.

The prospect of individualized anti-cancer treatment will bring about a change in the way a patient is managed. A likely clinical scenario is that a tumor sample is obtained at the time of presentation, and banked. From this sample, the tumor can be typed from a panel of pre-existing cancerous disease modifying antibodies. The patient will be conventionally staged but the available antibodies can be of use in further staging the patient. The patient can be treated immediately with the existing antibodies, and a panel of antibodies specific to the tumor can be produced either using the methods outlined herein or through the use of phage display libraries in conjunction with the screening methods herein disclosed. All the antibodies generated will be added to the library of anti-cancer antibodies since there is a possibility that other tumors can bear some of the same epitopes as the one that is being treated. The antibodies produced according to this method may be useful to treat cancerous disease in any number of patients who have cancers that bind to these antibodies.

In addition to anti-cancer antibodies, the patient can elect to receive the currently recommended therapies as part of a multi-modal regimen of treatment. The fact that the antibodies isolated via the present methodology are relatively non-toxic to non-cancerous cells allows for combinations of antibodies at high doses to be used, either alone, or in conjunction with conventional therapy. The high therapeutic index will also permit re-treatment on a short time scale that should decrease the likelihood of emergence of treatment resistant cells.

If the patient is refractory to the initial course of therapy or metastases develop, the process of generating specific antibodies to the tumor can be repeated for re-treatment. Furthermore, the anti-cancer antibodies can be conjugated to red blood cells obtained from that patient and re-infused for treatment of metastases. There have been few effective treatments for metastatic cancer and metastases usually portend a poor outcome resulting in death. However, metastatic cancers are usually well vascularized and the delivery of anti-cancer antibodies by red blood cells can have the effect of concentrating the antibodies at the site of the tumor. Even prior to metastases, most cancer cells are dependent on the host's blood supply for their survival and an anti-cancer antibody conjugated to red blood cells can be effective against *in situ* tumors as well. Alternatively, the antibodies may be conjugated to other hematogenous cells, e.g. lymphocytes, macrophages, monocytes, natural killer cells, etc.

There are five classes of antibodies and each is associated with a function that is conferred by its heavy chain. It is generally thought that cancer cell killing by naked antibodies are mediated either through antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) or complement dependent cytotoxicity (CDC). For example murine IgM and IgG2a antibodies can activate human complement by binding the C-1 component of the complement system thereby activating the classical pathway of complement activation which can lead to tumor lysis. For human antibodies the most effective complement activating antibodies are generally IgM and IgG1. Murine antibodies of the IgG2a and IgG3 isotype are effective at recruiting cytotoxic cells that have Fc receptors which will lead to cell killing by monocytes, macrophages, granulocytes and certain lymphocytes. Human antibodies of both the IgG1 and IgG3 isotype mediate ADCC.

The cytotoxicity mediated through the Fc region requires the presence of effector cells, their corresponding receptors, or proteins e.g. NK cells, T-cells and complement. In the absence of these effector mechanisms, the Fc portion of an antibody is inert. The Fc portion of an antibody may confer properties that affect the pharmacokinetics of an antibody *in vivo*, but *in vitro* this is not operative.

Another possible mechanism of antibody mediated cancer killing may be through the use of antibodies that function to catalyze the hydrolysis of various chemical bonds in the cell membrane and its associated glycoproteins or glycolipids, so-called catalytic antibodies.

There are three additional mechanisms of antibody-mediated cancer cell killing. The first is the use of antibodies as a vaccine to induce the body to produce an immune response against the putative antigen that resides on the cancer cell. The second is the use of antibodies to target growth receptors and interfere with their function or to down regulate that receptor so that its function is effectively lost. The third is the effect of such antibodies on direct ligation of cell surface moieties that may lead to direct cell death, such as ligation of death receptors such as TRAIL R1 or TRAIL R2, or integrin molecules such as alpha V beta 3 and the like.

The clinical utility of a cancer drug is based on the benefit of the drug under an acceptable risk profile to the patient. In cancer therapy survival has generally been the most sought after benefit, however there are a number of other well-recognized benefits in addition

to prolonging life. These other benefits, where treatment does not adversely affect survival, include symptom palliation, protection against adverse events, prolongation in time to recurrence or disease-free survival, and prolongation in time to progression. These criteria are generally accepted and regulatory bodies such as the U.S. Food and Drug Administration (F.D.A.) approve drugs that produce these benefits (Hirschfeld *et al.* Critical Reviews in Oncology/Hematolgy 42:137-143 2002). In addition to these criteria it is well recognized that there are other endpoints that may presage these types of benefits. In part, the accelerated approval process granted by the U.S. F.D.A. acknowledges that there are surrogates that will likely predict patient benefit. As of year-end 2003, there have been sixteen drugs approved under this process, and of these, four have gone on to full approval, i.e., follow-up studies have demonstrated direct patient benefit as predicted by surrogate endpoints. One important endpoint for determining drug effects in solid tumors is the assessment of tumor burden by measuring response to treatment (Therasse *et al.* Journal of the National Cancer Institute 92(3):205-216 2000). The clinical criteria (RECIST criteria) for such evaluation have been promulgated by Response Evaluation Criteria in Solid Tumors Working Group, a group of international experts in cancer. Drugs with a demonstrated effect on tumor burden, as shown by objective responses according to RECIST criteria, in comparison to the appropriate control group tend to, ultimately, produce direct patient benefit. In the pre-clinical setting tumor burden is generally more straightforward to assess and document. In that pre-clinical studies can be translated to the clinical setting, drugs that produce prolonged survival in pre-clinical models have the greatest anticipated clinical utility. Analogous to producing positive responses to clinical treatment, drugs that reduce tumor burden in the pre-clinical setting may also have significant direct impact on the disease. Although prolongation of survival is the most sought after clinical outcome from cancer drug treatment, there are other benefits that have clinical utility and it is clear that tumor burden reduction, which may correlate to a delay in disease progression, extended survival or both, can also lead to direct benefits and have clinical impact (Eckhardt *et al.* Developmental Therapeutics: Successes and Failures of Clinical Trial Designs of Targeted Compounds; ASCO Educational Book, 39th Annual Meeting, 2003, pages 209-219).

Using substantially the process of U.S. 6,180,357, and as disclosed in U.S. patent application S.N. 11/709,676 the contents of each of which are herein incorporated by

reference, the mouse monoclonal antibody, AR47A6.4.2 was obtained following immunization of mice with cells from human ovarian tumor tissue. The AR47A6.4.2 antigen was expressed on the cell surface of a wide range of human cell lines from different tissue origins. The ovarian cancer cell line OVCAR-3 was susceptible to the cytotoxic effect of AR47A6.4.2 *in vitro*.

The result of AR47A6.4.2 cytotoxicity against human cancer cells *in vitro* was further extended by demonstrating its anti-tumor activity *in vivo* (as disclosed in S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 prevented tumor growth and reduced tumor burden in an *in vivo* prophylactic BxPC-3 model of human pancreatic cancer. On day 49 post-implantation, the last day of treatment, the mean tumor volume in the AR47A6.4.2 treated group was 53 percent less than that of the buffer control-treated group ($p<0.05$). There were no clinical signs of toxicity throughout the study. In summary, AR47A6.4.2 was well-tolerated and decreased the tumor burden in this human pancreatic cancer xenograft model.

To further determine the efficacy of AR47A6.4.2 on the BxPC-3 model of human pancreatic cancer, the antibody was tested on an established BxPC-3 xenograft model (as disclosed in S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 significantly reduced tumor burden in an established model of human pancreatic cancer. On day 54, one day after the last dose of antibody was administered, AR47A6.4.2-treated animals had a mean tumor volume that was 40 percent of the mean tumor volume in the control-treated animals ($p<0.0001$). These results correspond to a mean T/C of 30 percent for AR47A6.4.2. There were no clinical signs of toxicity throughout the study. In summary, AR47A6.4.2 was well-tolerated and decreased the tumor burden in this established human pancreatic cancer xenograft model. AR47A6.4.2 has demonstrated efficacy in both a preventative and established model of human pancreatic cancer.

AR47A6.4.2 has demonstrated anti-cancer effects in against a human pancreatic cancer model. To extend this finding AR47A6.4.2 was tested on a xenograft model of PL45 human pancreatic cancer (as disclosed in S.N. 11/79,676). AR47A6.4.2 completely inhibited tumor growth in the PL45 *in vivo* prophylactic model of human pancreatic cancer. Treatment with ARIUS antibody AR47A6.4.2 reduced the growth of PL45 tumors by nearly 100 percent ($p=0.0005$, t-test), compared to the buffer-treated group, as determined on day 77, 20 days after the last dose of antibody when almost all mice in

control and antibody-treated group were living. At day 102, 45 days after last dose, all mice in the control group had been removed from the study due to tumor volume. However AR47A6.4.2 still demonstrated almost complete inhibition of tumor growth and 4 mice (some mice had been lost due to non-cancer related incidents) in that group were still alive. There were no obvious clinical signs of toxicity throughout the study. In summary, AR47A6.4.2 was well-tolerated and almost completely inhibited the tumor growth in this human pancreatic cancer xenograft model. AR47A6.4.2 treatment also demonstrated increased survival in comparison to buffer treatment. AR47A6.4.2 therefore has demonstrated efficacy in two different models of human pancreatic cancer.

AR47A6.4.2 has demonstrated anti-cancer properties against two different human pancreatic cancer xenograft models. To determine the efficacy of AR47A6.4.2 against a different human cancer xenograft model, the antibody was tested on a PC-3 prostate cancer xenograft model (as disclosed in S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 inhibited tumor growth in the PC-3 *in vivo* prophylactic model of human prostate adenocarcinoma cells. Treatment with ARIUS antibody AR47A6.4.2 reduced the growth of PC-3 tumors by 60.9 percent ($p=0.00037$, t-test), compared to the buffer treated group, as determined on day 32 after 5 doses of treatment with antibody when almost all mice in control and antibody-treated group were still alive. All mice in the control group had been removed from the study by day 47, 3 days before the last dose of antibody, due to tumor volume/lesions. At day 77, 27 days after last dose of antibody, 40 percent of the mice in the AR47A6.4.2-treated group still were still alive. There were no obvious clinical signs of toxicity throughout the study. In summary, AR47A6.4.2 was well-tolerated and significantly inhibited the tumor growth in this human prostate cancer xenograft model. Treatment with antibody also demonstrated a survival benefit in comparison to the control group. AR47A6.4.2 has demonstrated efficacy against two different human cancer indications: pancreatic and prostate.

AR47A6.4.2 has demonstrated anti-cancer properties against two different human pancreatic and a prostate cancer xenograft model. To determine the efficacy of AR47A6.4.2 against another human cancer xenograft model, the antibody was tested on a MCF-7 cancer xenograft model (as disclosed in S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 reduced tumor growth in the MCF-7 *in vivo* prophylactic model of human breast cancer. Treatment with ARIUS antibody AR47A6.4.2 resulted in a marked tumor growth delay. AR47A6.4.2

induced T/C percent values that were lower than 42 percent from day 18 to day 35 of treatment and close to 42 percent up to day 49 (optimal T/C percent value of 10.9 percent at day 18). At day 53, after treatment was terminated, efficacy with treatment of AR47A6.4.2 was still observed with a T/C of 57 percent. At the end of the study (day 91), 2 mice from the AR47A6.4.2 treatment group remained tumor-free. A post-treatment survival benefit was associated with AR47A6.4.2 administration. The buffer control group reached 100 percent mortality by day 85 post-treatment while 33.3 percent of the AR47A6.4.2 mice were still alive at day 91 post-treatment. There were no clinical signs of toxicity throughout the study. In summary, AR47A6.4.2 was well-tolerated, reduced tumor growth and provided a survival benefit in this human breast cancer xenograft model. AR47A6.4.2 has demonstrated efficacy against three different human cancer indications; pancreatic, prostate and breast.

AR47A6.4.2 has demonstrated anti-cancer properties against two different human pancreatic, a prostate and a breast cancer xenograft model. To determine the efficacy of AR47A6.4.2 against another human cancer xenograft model, the antibody was tested on a Colo 205 colon cancer xenograft model (as disclosed in S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 inhibited tumor growth in the Colo 205 *in vivo* prophylactic model of human colorectal adenocarcinoma cells. Treatment with ARIUS antibody AR47A6.4.2 reduced the growth of Colo 205 tumors by 60.2 percent ($p=0.0003851$, t-test), compared to the buffer-treated group, as determined on day 27, 4 days before the last dose of antibody. There were no obvious clinical signs of toxicity throughout the study. In summary, AR47A6.4.2 was well-tolerated and significantly inhibited the tumor growth in this human colon cancer xenograft model. AR47A6.4.2 has demonstrated efficacy against four different human cancer indications; pancreatic, prostate, breast and colon. Treatment benefits were observed in several well-recognized models of human cancer disease suggesting pharmacologic and pharmaceutical benefits of this antibody for therapy in other mammals, including man. *In toto*, this data demonstrates that the AR47A6.4.2 antigen is a cancer associated antigen and is expressed on human cancer cells, and is a pathologically relevant cancer target.

As disclosed previously (S.N. 11/709,676), biochemical data indicated that the antigen recognized by AR47A6.4.2 is TROP-2. This was supported by studies that showed a monoclonal antibody (clone 77220.11, R&D Systems, Minneapolis, MN) reactive against TROP-2 identifies proteins that were bound to AR47A6.4.2 by immunoprecipitation. In

addition, AR47A6.4.2 specifically recognized the recombinant form of human TROP-2 by Western Immunoblot. The AR47A6.4.2 epitope does not appear to be carbohydrate dependent but does appear to be conformation dependent. AR47A6.4.2 was also demonstrated to bind to a distinct epitope from another anti-TROP-2 antibody: AR52A301.5.

In order to determine the utility of the AR47A6.4.2 epitope, the expression of AR47A6.4.2 antigen in frozen normal human tissue sections (experiments showed no reactivity of this antibody with formalin fixed tissues) was previously determined (as disclosed in S.N. 11/709,676). Binding to 12 human normal organs, ovary, pancreas, thyroid, brain (cerebrum, cerebellum), lung, spleen, uterus, cervix, heart, skin, and skeletal muscle was performed using a human normal tissue screening array (Biochain, CA, USA). The array contained 20 normal human organs; however only 12 of the organs were interpretable after staining. The AR47A6.4.2 antibody showed binding predominantly to epithelial tissues (endothelium of blood vessels, follicular epithelium of thyroid, acinar and ductal epithelium of pancreas, alveolar epithelium of lung, and epidermal keratinocytes of skin). The antibody also showed equivocal binding to lymphoid tissue of the spleen and binding to neural tissue of the brain. Cellular localization was cytoplasmic and membranous with diffuse staining pattern. AR47A6.4.2 showed a similar binding pattern when compared to a research anti-TROP-2 antibody (clone 77220.11).

To further extend the therapeutic benefit of AR47A6.4.2, the frequency and localization of the antigen within various human cancer tissues and their corresponding normal tissue sections (10 colon cancers and 1 normal colon, 7 ovarian cancers and 1 normal ovary, 11 breast cancers and 3 normal breast, 14 lung cancers and 3 normal lung, 13 prostate cancers and 3 normal prostate, and 13 pancreatic cancers and 4 normal pancreas) was also previously determined (as disclosed in S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 showed moderate to strong binding to 5/10 (50 percent), 6/7 (86 percent), 10/11 (91 percent), 11/14 (79 percent), 13/13 (100 percent) and 2/13 (15 percent) of colon, ovarian, breast, lung, prostate and pancreatic cancers, respectively. In addition, equivocal to weak binding was observed in 2/10 (20 percent), 1/11 (9 percent), 3/14 (21 percent), and 2/13 (15 percent) colon, breast, lung and pancreatic cancer sections, respectively. In all of the tested tumors, the binding was specific for the tumor cells. For the corresponding normal tissues the antibody showed binding to 0/1,

0/1, 3/3, 3/3, 3/3 and 4/4 of normal colon, ovary, breast, lung, prostate, and pancreatic tissues. However, the binding was predominantly to the epithelial tissues of the normal organs.

IHC studies were previously conducted to characterize the AR47A6.4.2 antigen cross reactivity in frozen normal tissues of various species (as disclosed in S.N. 11/709,676). AR47A6.4.2 showed no detectable binding to the tested mouse, rat, guinea pig, goat, sheep, hamster, chicken, cow, horse or pig normal tissues. For the normal rabbit and dog tissues, there was dissimilar binding to that observed in the corresponding human tissues. For the cynomolgus monkey normal tissues, AR47A6.4.2 showed similar tissue specificity as observed in the corresponding human normal tissues for all of the tested organs except for the ovary and testis in which no detectable binding was observed for the cynomolgus monkey sections. For the rhesus monkey normal tissues, AR47A6.4.2 showed similar tissue specificity as observed in the corresponding human normal tissues. It should be noted that the rhesus monkey normal tissue panel was smaller than what was tested for the cynomolgus monkey. Based on the staining profiles, both the cynomolgus and rhesus monkey have similar AR47A6.4.2 antigen distribution to human tissues.

To facilitate production of antibody chimera, the genes encoding the variable regions of both heavy and light chains were separately cloned and sequenced (as previously disclosed in S.N. 11/709,676).

The present invention describes the development and use of AR47A6.4.2, chimeric AR47A6.4.2 ((ch)AR47A6.4.2) and humanized variants, (hu)AR47A6.4.2. AR47A6.4.2 was identified by its effect in cytotoxic assays, in tumor growth models and in prolonging survival time in mammals suffering from cancerous disease. This invention represents an advance in the field of cancer treatment in that it describes, for the first time, reagents that bind specifically to an epitope or epitopes present on the target molecule, TROP-2, and that also have *in vitro* cytotoxic properties, as a naked antibody, against malignant tumor cells but not normal cells, and which also directly mediate, as a naked antibody, inhibition of tumor growth and extension of survival in *in vivo* models of human cancer. This is an advance in relation to any other previously described anti-TROP-2 antibody, since none have been shown to have similar properties. It also provides an advance in the field since it clearly demonstrates, and for the first time, the direct involvement of TROP-2 in events associated with growth and development of certain types of tumors. It also represents an

advance in cancer therapy since it has the potential to display similar anti-cancer properties in human patients. A further advance is that inclusion of these antibodies in a library of anti-cancer antibodies will enhance the possibility of targeting tumors expressing different antigen markers by determination of the appropriate combination of different anti-cancer antibodies, to find the most effective in targeting and inhibiting growth and development of the tumors.

In all, this invention teaches the use of the AR47A6.4.2 antigen as a target for a therapeutic agent, that when administered can reduce the tumor burden of a cancer expressing the antigen in a mammal, and can also lead to a prolonged survival of the treated mammal. This invention also teaches the use of CDMAB (AR47A6.4.2, chimeric AR47A6.4.2 ((ch)AR47A6.4.2) and humanized variants, (hu)AR47A6.4.2), and its derivatives, and antigen binding fragments thereof, and cellular cytotoxicity inducing ligands thereof to target their antigen to reduce the tumor burden of a cancer expressing the antigen in a mammal, and lead to prolonged survival of the treated mammal. Furthermore, this invention also teaches the use of detecting the AR47A6.4.2 antigen in cancerous cells that can be useful for the diagnosis, prediction of therapy, and prognosis of mammals bearing tumors that express this antigen.

Accordingly, it is an objective of the invention to utilize a method for producing cancerous disease modifying antibodies (CDMAB) raised against cancerous cells derived from a particular individual, or one or more particular cancer cell lines, which CDMAB are cytotoxic with respect to cancer cells while simultaneously being relatively non-toxic to non-cancerous cells, in order to isolate hybridoma cell lines and the corresponding isolated monoclonal antibodies and antigen binding fragments thereof for which said hybridoma cell lines are encoded.

It is an additional objective of the invention to teach cancerous disease modifying antibodies, ligands and antigen binding fragments thereof.

It is a further objective of the instant invention to produce cancerous disease modifying antibodies whose cytotoxicity is mediated through antibody dependent cellular toxicity.

It is yet an additional objective of the instant invention to produce cancerous disease modifying antibodies whose cytotoxicity is mediated through complement dependent cellular toxicity.

It is still a further objective of the instant invention to produce cancerous disease modifying antibodies whose cytotoxicity is a function of their ability to catalyze hydrolysis of cellular chemical bonds.

A still further objective of the instant invention is to produce cancerous disease modifying antibodies which are useful for in a binding assay for diagnosis, prognosis, and monitoring of cancer.

Other objects and advantages of this invention will become apparent from the following description wherein are set forth, by way of illustration and example, certain embodiments of this invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

The patent or application file contains at least one drawing executed in color. Copies of this patent or patent application publication with color drawing(s) will be provided by the Office upon request and payment of the necessary fee.

Figure 1 demonstrates the effect of AR47A6.4.2 on tumor growth in a prophylactic human MDA-MB-231 breast cancer model. The vertical dashed lines indicate the period during which the antibody was intraperitoneally administered. Data points represent the mean +/- SEM.

Figure 2 demonstrates the effect of AR47A6.4.2 on mouse survival in a prophylactic MDA-MB-231 breast cancer model. Data points represent the survival percentage.

Figure 3 demonstrates the effect of AR47A6.4.2 on mouse body weight in a prophylactic MDA-MB-231 breast adenocarcinoma model. Data points represent the mean +/- SEM.

Figure 4 demonstrates the effect of AR47A6.4.2 on tumor growth in an established human PL45 pancreatic cancer model in a dose-response manner. The vertical dashed lines indicate the period during which the antibody was intraperitoneally administered. Data points represent the mean +/- SEM.

Figure 5 demonstrates the effect of AR47A6.4.2 on mouse survival in an established PL45 pancreatic cancer model. Data points represent the survival percentage.

Figure 6 demonstrates the effect of AR47A6.4.2 on mouse body weight in an established PL45 pancreatic cancer model. Data points represent the mean +/- SEM.

Figure 7 tabulates an IHC comparison of AR47A6.4.2 on various human tumor and normal tissue sections from different tissue micro arrays.

Figure 8. Representative micrographs showing the binding pattern on breast tumor tissue obtained with AR47A6.4.2 (A) or the isotype control antibody (B) and on prostate tumor tissue obtained with AR47A6.4.2 (C) or the isotype control antibody (D) and on pancreatic tumor tissue obtained with AR47A6.4.2 (E) or the isotype control antibody (F) from various human tumor tissue microarrays. Magnification is 400X for the breast and pancreatic tumor tissue and 200X for the prostate tumor tissue.

Figure 9. Representative micrographs showing the binding pattern obtained with AR47A6.4.2 on ovarian tumor tissue (A) or ovarian normal tissue (B). AR47A6.4.2 showed strong binding to the tumor but not the corresponding normal tissue. Magnification is 200X.

Figure 10. List of kinases whose phosphorylation is affected by treatment of BxPC-3 cells treated with AR47A6.4.2 followed by serum and supplement stimulation.

Figure 11. List of secreted angiogenic factors affected by the treatment of BxPC-3 cells treated with AR47A6.4.2.

Figure 12 demonstrates *in vitro* CDC activity of AR47A6.4.2 on two different human pancreatic cancer cell lines; PL45 and BxPC-3.

Figure 13. Binding of AR47A6.4.2 to CLIPS peptides (SEQ ID NOS 13-32, respectively, in order of appearance) that were synthesized based on the TROP-2 amino acid sequence.

Figure 14. Amino acid sequence of TROP-2 (SEQ ID NO: 33). The discontinuous epitope recognized by AR47A6.4.2 is contained within the underlined sequences. Amino acid positions 1-274 represent the extracellular portion of TROP-2; amino acid positions 275-290 represent the transmembrane portion of TROP-2 and amino acid positions 291-232 represent the intracellular portion of TROP-2.

Figure 15. Primers used in the PCR amplification of light chain (SEQ ID NOS: 34-52, respectively, in order of appearance).

Figure 16. Primers used in the PCR amplification of heavy chain (SEQ ID NOS: 53-68, respectively, in order of appearance).

Figure 17. Mouse AR47A6.4.2 VH Sequence (Nucleotide and amino acid sequences disclosed as SEQ ID NOS: 69-70, respectively).

Figure 18. Mouse AR47A6.4.2 VL Sequence (Nucleotide and amino acid sequences disclosed as SEQ ID NOS: 71-72, respectively).

Figure 19. Oligonucleotides used for the generation of chimeric and variant humanized AR47A6.4.2 VH sequences (SEQ ID NOS: 73-92, respectively, in order of appearance).

Figure 20. Oligonucleotides used for the generation of chimeric and variant humanized AR47A6.4.2 VL sequences (SEQ ID NOS: 93-110, respectively, in order of appearance).

Figure 21. Light chain and heavy chain expression vectors.

Figures 22A,22B and 22C. Humanized AR47A6.4.2 VH variants. CDRs are underlined (SEQ ID NOS: 111-113, 10, 7 and 114, respectively, in order of appearance).

Figures 23A, 23B and 23C. Humanized AR47A6.4.2 VL variants. CDRs are underlined (SEQ ID NOS: 115, 9, 8 and 116-117, respectively, in order of appearance).

Figure 24. Activities of humanized AR47A6.4.2 VH and VL variants.

Figure 25. Summary of the binding affinity association rate constants (Ka) and dissociation rate constants (Kd) of murine AR47A6.4.2 and various variants of (hu)AR47A.6.4.2 to rhTROP-2.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In general, the following words or phrases have the indicated definition when used in the summary, description, examples, and claims.

The term "antibody" is used in the broadest sense and specifically covers, for example, single monoclonal antibodies (including agonist, antagonist, and neutralizing antibodies, de-immunized, murine, chimeric or humanized antibodies), antibody compositions with polyepitopic specificity, single-chain antibodies, diabodies, triabodies, immunoconjugates and antibody fragments (see below).

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, i.e., the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed

against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations which include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma (murine or human) method first described by Kohler *et al.*, *Nature,* 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, e.g., U.S. Pat. No.4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature,* 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.,* 222:581-597 (1991), for example.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably comprising the antigen-binding or variable region thereof. Examples of antibody fragments include less than full length antibodies, Fab, Fab', $F(ab')_2$, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; single-chain antibodies, single domain antibody molecules, fusion proteins, recombinant proteins and multispecific antibodies formed from antibody fragment(s).

An "intact" antibody is one which comprises an antigen-binding variable region as well as a light chain constant domain (C_L) and heavy chain constant domains, C_H1, C_H2 and C_H3. The constant domains may be native sequence constant domains (e.g. human native sequence constant domains) or amino acid sequence variant thereof. Preferably, the intact antibody has one or more effector functions.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, intact antibodies can be assigned to different "classes". There are five-major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into "subclasses" (isotypes), e.g., IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of antibodies are called α, δ, ε, γ, and μ, respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region (a native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region) of an antibody. Examples of antibody effector functions include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (e.g. B cell receptor; BCR), etc.

"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" and "ADCC" refer to a cell-mediated reaction in which nonspecific cytotoxic cells that express Fc receptors (FcRs) (e.g. Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express FcγRIII only, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII and FcγRIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an in vitro ADCC assay, such as that described in U.S. Pat. No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al. PNAS* (USA) 95:652-656 (1998).

"Effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least FcγRIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils; with PBMCs and NK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source thereof, e.g. from blood or PBMCs as described herein.

The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, and Fcγ RIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an

immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (see review M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 24:2429 (1994)).

"Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the ability of a molecule to lyse a target in the presence of complement. The complement activation pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to a molecule (e.g. an antibody) complexed with a cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, e.g. as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed.

The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called hypervariable regions both in the light chain and the heavy chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the framework regions (FRs). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β-sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β-sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region generally comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (e.g. residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) and/or those residues from a "hypervariable loop" (e.g. residues 2632 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). "Framework Region" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined. Papain digestion of antibodies produces two identical antigen-binding fragments, called "Fab" fragments, each with a single antigen-binding site, and a residual "Fc" fragment, whose name reflects its ability to crystallize readily. Pepsin treatment yields an $F(ab')_2$ fragment that has two antigen-binding sites and is still capable of cross-linking antigen.

"Fv" is the minimum antibody fragment which contains a complete antigen-recognition and antigen-binding site. This region consists of a dimer of one heavy chain and one light chain variable domain in tight, non-covalent association. It is in this configuration that the three hypervariable regions of each variable domain interact to define an antigen-binding site on the surface of the V_H-V_L dimer. Collectively, the six hypervariable regions confer antigen-binding specificity to the antibody. However, even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three hypervariable regions specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although at a lower affinity than the entire binding site. The Fab fragment also contains the constant domain of the light chain and the first constant domain (CH I) of the heavy chain. Fab' fragments differ from Fab fragments by the addition of a few residues at the carboxy terminus of the heavy chain CH1 domain including one or more cysteines from the antibody hinge region. Fab'-SH is the designation herein for Fab' in which the cysteine residue(s) of the constant domains bear at least one free thiol group. $F(ab')_2$ antibody fragments originally were produced as pairs of Fab' fragments which have

hinge cysteines between them. Other chemical couplings of antibody fragments are also known.

The "light chains" of antibodies from any vertebrate species can be assigned to one of two clearly distinct types, called kappa (κ) and lambda (λ), based on the amino acid sequences of their constant domains.

"Single-chain Fv" or "scFv" antibody fragments comprise the V_H and V_L domains of antibody, wherein these domains are present in a single polypeptide chain. Preferably, the Fv polypeptide further comprises a polypeptide linker between the V_H and V_L domains which enables the scFv to form the desired structure for antigen binding. For a review of scFv see Plückthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

The term "diabodies" refers to small antibody fragments with two antigen-binding sites, which fragments comprise a variable heavy domain (V_H) connected to a variable light domain (V_L) in the same polypeptide chain (V_H-V_L). By using a linker that is too short to allow pairing between the two domains on the same chain, the domains are forced to pair with the complementary domains of another chain and create two antigen-binding sites. Diabodies are described more fully in, for example, EP 404,097; WO 93/11161; and Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:6444-6448 (1993).

The term "triabodies" or "trivalent trimers" refers to the combination of three single chain antibodies. Triabodies are constructed with the amino acid terminus of a V_L or V_H domain, i.e., without any linker sequence. A triabody has three Fv heads with the polypeptides arranged in a cyclic, head-to-tail fashion. A possible conformation of the triabody is planar with the three binding sites located in a plane at an angle of 120 degrees from one another. Triabodies can be monospecific, bispecific or trispecific.

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. Isolated antibody includes the antibody in situ within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

An antibody "which binds" an antigen of interest, e.g. TROP-2 antigen, is one capable of binding that antigen with sufficient affinity such that the antibody is useful as a therapeutic or diagnostic agent in targeting a cell expressing the antigen. Where the antibody is one which binds TROP-2, it will usually preferentially bind TROP-2 as opposed to other receptors, and does not include incidental binding such as non-specific Fc contact, or binding to post-translational modifications common to other antigens and may be one which does not significantly cross-react with other proteins. Methods, for the detection of an antibody that binds an antigen of interest, are well known in the art and can include but are not limited to assays such as FACS, cell ELISA and Western blot.

As used herein, the expressions "cell", "cell line", and "cell culture" are used interchangeably, and all such designations include progeny. It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. It will be clear from the context where distinct designations are intended.

"Treatment or treating" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) the targeted pathologic condition or disorder. Those in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in whom the disorder is to be prevented. Hence, the mammal to be treated herein may have been diagnosed as having the disorder or may be predisposed or susceptible to the disorder.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth or death. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer (e.g. epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal

cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, as well as head and neck cancer.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclosphosphamide (CYTOXAN™); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, triethylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabicin, carnomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elformithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK®; razoxane; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2,2′,2″-trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C");

cyclophosphamide; thiotepa; taxanes, e.g. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) and docetaxel (TAXOTERE®, Aventis, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambucil; gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

"Mammal" for purposes of treatment refers to any animal classified as a mammal, including humans, mice, SCID or nude mice or strains of mice, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as sheep, dogs, horses, cats, cows, etc. Preferably, the mammal herein is human.

"Oligonucleotides" are short-length, single- or double-stranded polydeoxynucleotides that are chemically synthesized by known methods (such as phosphotriester, phosphite, or phosphoramidite chemistry, using solid phase techniques such as described in EP 266,032, published 4 May 1988, or via deoxynucleoside H-phosphonate intermediates as described by Froehler *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 14:5399-5407, 1986. They are then purified on polyacrylamide gels.

In accordance with the present invention, "humanized" and/or "chimeric" forms of non-human (e.g. murine) immunoglobulins refer to antibodies which contain specific chimeric immunoglobulins, immunoglobulin chains or fragments thereof (such as Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ or other antigen-binding subsequences of antibodies) which results in the decrease of a human anti-mouse antibody (HAMA), human anti-chimeric antibody (HACA) or a human anti-human antibody (HAHA) response, compared to the original antibody, and contain the requisite portions (e.g. CDR(s), antigen binding region(s), variable domain(s) and

so on) derived from said non-human immunoglobulin, necessary to reproduce the desired effect, while simultaneously retaining binding characteristics which are comparable to said non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from the complementarity determining regions (CDRs) of the recipient antibody are replaced by residues from the CDRs of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat or rabbit having the desired specificity, affinity and capacity. In some instances, Fv framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human FR residues. Furthermore, the humanized antibody may comprise residues which are found neither in the recipient antibody nor in the imported CDR or FR sequences. These modifications are made to further refine and optimize antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the CDR regions correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FR residues are those of a human immunoglobulin consensus sequence. The humanized antibody optimally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin.

"De-immunized" antibodies are immunoglobulins that are non-immunogenic, or less immunogenic, to a given species. De- immunization can be achieved through structural alterations to the antibody. Any de- immunization technique known to those skilled in the art can be employed. One suitable technique for de- immunizing antibodies is described, for example, in WO 00/34317 published June 15, 2000.

An antibody which induces "apoptosis" is one which induces programmed cell death by any means, illustrated by but not limited to binding of annexin V, caspase activity, fragmentation of DNA, cell shrinkage, dilation of endoplasmic reticulum, cell fragmentation, and/or formation of membrane vesicles (called apoptotic bodies).

As used herein "antibody induced cytotoxicity" is understood to mean the cytotoxic effect derived from the hybridoma supernatant or antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produeced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, antigen

binding fragments, or antibody ligands thereof, which effect is not necessarily related to the degree of binding.

Throughout the instant specification, hybridoma cell lines, as well as the isolated monoclonal antibodies which are produced therefrom, are alternatively referred to by their internal designation, AR47A6.4.2 (murine), (ch)AR47A6.4.2 (chimeric), (hu)AR47A6.4.2 (humanized) or Depository Designation, IDAC 141205-05.

As used herein "antibody-ligand" includes a moiety which exhibits binding specificity for at least one epitope of the target antigen, and which may be an intact antibody molecule, antibody fragments, and any molecule having at least an antigen-binding region or portion thereof (i.e., the variable portion of an antibody molecule), e.g., an Fv molecule, Fab molecule, Fab' molecule, F(ab').sub.2 molecule, a bispecific antibody, a fusion protein, or any genetically engineered molecule which specifically recognizes and binds at least one epitope of the antigen bound by the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line designated as IDAC 141205-05 (the IDAC 141205-05 antigen), a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 and antigen binding fragments.

As used herein “cancerous disease modifying antibodies” (CDMAB) refers to monoclonal antibodies which modify the cancerous disease process in a manner which is beneficial to the patient, for example by reducing tumor burden or prolonging survival of tumor bearing individuals, and antibody-ligands thereof.

A “CDMAB related binding agent”, in its broadest sense, is understood to include, but is not limited to, any form of human or non-human antibodies, antibody fragments, antibody ligands, or the like, which competitively bind to at least one CDMAB target epitope.

A “competitive binder” is understood to include any form of human or non-human antibodies, antibody fragments, antibody ligands, or the like which has binding affinity for at least one CDMAB target epitope.

Tumors to be treated include primary tumors and metastatic tumors, as well as refractory tumors. Refractory tumors include tumors that fail to respond or are resistant to

treatment with chemotherapeutic agents alone, antibodies alone, radiation alone or combinations thereof. Refractory tumors also encompass tumors that appear to be inhibited by treatment with such agents but recur up to five years, sometimes up to ten years or longer after treatment is discontinued.

Tumors that can be treated include tumors that are not vascularized, or not yet substantially vascularized, as well as vascularized tumors. Examples of solid tumors, which can be accordingly treated, include breast carcinoma, lung carcinoma, colorectal carcinoma, pancreatic carcinoma, glioma and lymphoma. Some examples of such tumors include epidermoid tumors, squamous tumors, such as head and neck tumors, colorectal tumors, prostate tumors, breast tumors, lung tumors, including small cell and non-small cell lung tumors, pancreatic tumors, thyroid tumors, ovarian tumors, and liver tumors. Other examples include Kaposi's sarcoma, CNS neoplasms, neuroblastomas, capillary hemangioblastomas, meningiomas and cerebral metastases, melanoma, gastrointestinal and renal carcinomas and sarcomas, rhabdomyosarcoma, glioblastoma, preferably glioblastoma multiforme, and leiomyosarcoma.

As used herein "antigen-binding region" means a portion of the molecule which recognizes the target antigen.

As used herein "competitively inhibits" means being able to recognize and bind a determinant site to which the monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line designated as IDAC 141205-05, (the IDAC 141205-05 antibody), a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, antigen binding fragments, or antibody ligands thereof, is directed using conventional reciprocal antibody competition assays. (Belanger L., Sylvestre C. and Dufour D. (1973), Enzyme linked immunoassay for alpha fetoprotein by competitive and sandwich procedures. Clinica Chimica Acta 48, 15).

As used herein "target antigen" is the IDAC 141205-05 antigen or portions thereof.

As used herein, an "immunoconjugate" means any molecule or CDMAB such as an antibody chemically or biologically linked to cytotoxins, radioactive agents, cytokines,

interferons, target or reporter moieties, enzymes, toxins, anti-tumor drugs or therapeutic agents. The antibody or CDMAB may be linked to the cytotoxin, radioactive agent, cytokine, interferon, target or reporter moiety, enzyme, toxin, anti-tumor drug or therapeutic agent at any location along the molecule so long as it is able to bind its target. Examples of immunoconjugates include antibody toxin chemical conjugates and antibody-toxin fusion proteins.

Radioactive agents suitable for use as anti-tumor agents are known to those skilled in the art. For example, 131I or 211At is used. These isotopes are attached to the antibody using conventional techniques (e.g. Pedley *et al.*, Br. J. Cancer 68, 69-73 (1993)). Alternatively, the anti-tumor agent which is attached to the antibody is an enzyme which activates a prodrug. A prodrug may be administered which will remain in its inactive form until it reaches the tumor site where it is converted to its cytotoxin form once the antibody complex is administered. In practice, the antibody-enzyme conjugate is administered to the patient and allowed to localize in the region of the tissue to be treated. The prodrug is then administered to the patient so that conversion to the cytotoxic drug occurs in the region of the tissue to be treated. Alternatively, the anti-tumor agent conjugated to the antibody is a cytokine such as interleukin-2 (IL-2), interleukin-4 (IL-4) or tumor necrosis factor alpha (TNF-α). The antibody targets the cytokine to the tumor so that the cytokine mediates damage to or destruction of the tumor without affecting other tissues. The cytokine is fused to the antibody at the DNA level using conventional recombinant DNA techniques. Interferons may also be used.

As used herein, a "fusion protein" means any chimeric protein wherein an antigen binding region is connected to a biologically active molecule, e.g., toxin, enzyme, fluorescent proteins, luminescent marker, polypeptide tag, cytokine, interferon, target or reporter moiety or protein drug.

The invention further contemplates CDMAB of the present invention to which target or reporter moieties are linked. Target moieties are first members of binding pairs. Anti-tumor agents, for example, are conjugated to second members of such pairs and are thereby directed to the site where the antigen-binding protein is bound. A common example of such a binding pair is avidin and biotin. In a preferred embodiment, biotin is conjugated to the target antigen of the CDMAB of the present invention, and thereby provides a target for

an anti-tumor agent or other moiety which is conjugated to avidin or streptavidin. Alternatively, biotin or another such moiety is linked to the target antigen of the CDMAB of the present invention and used as a reporter, for example in a diagnostic system where a detectable signal-producing agent is conjugated to avidin or streptavidin.

Detectable signal-producing agents are useful *in vivo* and *in vitro* for diagnostic purposes. The signal producing agent produces a measurable signal which is detectable by external means, usually the measurement of electromagnetic radiation. For the most part, the signal producing agent is an enzyme or chromophore, or emits light by fluorescence, phosphorescence or chemiluminescence. Chromophores include dyes which absorb light in the ultraviolet or visible region, and can be substrates or degradation products of enzyme catalyzed reactions.

Moreover, included within the scope of the present invention is use of the present CDMAB *in vivo* and *in vitro* for investigative or diagnostic methods, which are well known in the art. In order to carry out the diagnostic methods as contemplated herein, the instant invention may further include kits, which contain CDMAB of the present invention. Such kits will be useful for identification of individuals at risk for certain type of cancers by detecting over-expression of the CDMAB's target antigen on cells of such individuals.

Diagnostic Assay Kits

It is contemplated to utilize the CDMAB of the present invention in the form of a diagnostic assay kit for determining the presence of a tumor. The tumor will generally be detected in a patient based on the presence of one or more tumor-specific antigens, e.g. proteins and/or polynucleotides which encode such proteins in a biological sample, such as blood, sera, urine and/or tumor biopsies, which samples will have been obtained from the patient.

The proteins function as markers which indicate the presence or absence of a particular tumor, for example a colon, breast, lung or prostate tumor. It is further contemplated that the antigen will have utility for the detection of other cancerous tumors. Inclusion in the diagnostic assay kits of binding agents comprised of CDMABs of the present invention, or CDMAB related binding agents, enables detection of the level of antigen that binds to the agent in the biological sample. Polynucleotide primers and probes may be used to detect the level of mRNA encoding a tumor protein, which is also indicative of the presence

or absence of a cancer. In order for the binding assay to be diagnostic, data will have been generated which correlates statistically significant levels of antigen, in relation to that present in normal tissue, so as to render the recognition of binding definitively diagnostic for the presence of a cancerous tumor. It is contemplated that a plurality of formats will be useful for the diagnostic assay of the present invention, as are known to those of ordinary skill in the art, for using a binding agent to detect polypeptide markers in a sample. For example, as illustrated in Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Further contemplated are any and all combinations, permutations or modifications of the afore-described diagnostic assay formats.

The presence or absence of a cancer in a patient will typically be determined by (a) contacting a biological sample obtained from a patient with a binding agent; (b) detecting in the sample a level of polypeptide that binds to the binding agent; and (c) comparing the level of polypeptide with a predetermined cut-off value.

In an illustrative embodiment, it is contemplated that the assay will involve the use of a CDMAB based binding agent immobilized on a solid support to bind to and remove the polypeptide from the remainder of the sample. The bound polypeptide may then be detected using a detection reagent that contains a reporter group and specifically binds to the binding agent/polypeptide complex. Illustrative detection reagents may include a CDMAB based binding agent that specifically binds to the polypeptide or an antibody or other agent that specifically binds to the binding agent, such as an anti-immunoglobulin, protein G, protein A or a lectin. In an alternative embodiment, it is contemplated that a competitive assay may be utilized, in which a polypeptide is labeled with a reporter group and allowed to bind to the immobilized binding agent after incubation of the binding agent with the sample. Indicative of the reactivity of the sample with the immobilized binding agent, is the extent to which components of the sample inhibit the binding of the labeled polypeptide to the binding agent. Suitable polypeptides for use within such assays include full length tumor-specific proteins and/or portions thereof, to which the binding agent has binding affinity.

The diagnostic kit will be provided with a solid support which may be in the form of any material known to those of ordinary skill in the art to which the protein may be attached. Suitable examples may include a test well in a microtiter plate or a nitrocellulose or other suitable membrane. Alternatively, the support may be a bead or disc, such as glass,

fiberglass, latex or a plastic material such as polystyrene or polyvinylchloride. The support may also be a magnetic particle or a fiber optic sensor, such as those disclosed, for example, in U.S. Pat. No. 5,359,681.

It is contemplated that the binding agent will be immobilized on the solid support using a variety of techniques known to those of skill in the art, which are amply described in the patent and scientific literature. The term "immobilization" refers to both noncovalent association, such as adsorption, and covalent attachment, which, in the context of the present invention, may be a direct linkage between the agent and functional groups on the support, or may be a linkage by way of a cross-linking agent. In a preferred, albeit non-limiting embodiment, immobilization by adsorption to a well in a microtiter plate or to a membrane is preferable. Adsorption may be achieved by contacting the binding agent, in a suitable buffer, with the solid support for a suitable amount of time. The contact time may vary with temperature, and will generally be within a range of between about 1 hour and about 1 day.

Covalent attachment of binding agent to a solid support would ordinarily be accomplished by first reacting the support with a bifunctional reagent that will react with both the support and a functional group, such as a hydroxyl or amino group, on the binding agent. For example, the binding agent may be covalently attached to supports having an appropriate polymer coating using benzoquinone or by condensation of an aldehyde group on the support with an amine and an active hydrogen on the binding partner (see, e.g., Pierce Immunotechnology Catalog and Handbook, 1991, at A12 A13).

It is further contemplated that the diagnostic assay kit will take the form of a two-antibody sandwich assay. This assay may be performed by first contacting an antibody, e.g. the instantly disclosed CDMAB that has been immobilized on a solid support, commonly the well of a microtiter plate, with the sample, such that polypeptides within the sample are allowed to bind to the immobilized antibody. Unbound sample is then removed from the immobilized polypeptide-antibody complexes and a detection reagent (preferably a second antibody capable of binding to a different site on the polypeptide) containing a reporter group is added. The amount of detection reagent that remains bound to the solid support is then determined using a method appropriate for the specific reporter group.

In a specific embodiment, it is contemplated that once the antibody is immobilized on the support as described above, the remaining protein binding sites on the support will be blocked, via the use of any suitable blocking agent known to those of ordinary skill in the art, such as bovine serum albumin or Tween 20™ (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.). The immobilized antibody would then be incubated with the sample, and polypeptide would be allowed to bind to the antibody. The sample could be diluted with a suitable diluent, such as phosphate-buffered saline (PBS) prior to incubation. In general, an appropriate contact time (i.e., incubation time) would be selected to correspond to a period of time sufficient to detect the presence of polypeptide within a sample obtained from an individual with the specifically selected tumor. Preferably, the contact time is sufficient to achieve a level of binding that is at least about 95 percent of that achieved at equilibrium between bound and unbound polypeptide. Those of ordinary skill in the art will recognize that the time necessary to achieve equilibrium may be readily determined by assaying the level of binding that occurs over a period of time.

It is further contemplated that unbound sample would then be removed by washing the solid support with an appropriate buffer. The second antibody, which contains a reporter group, would then be added to the solid support. Incubation of the detection reagent with the immobilized antibody-polypeptide complex would then be carried out for an amount of time sufficient to detect the bound polypeptide. Subsequently, unbound detection reagent would then be removed and bound detection reagent would be detected using the reporter group. The method employed for detecting the reporter group is necessarily specific to the type of reporter group selected, for example for radioactive groups, scintillation counting or autoradiographic methods are generally appropriate. Spectroscopic methods may be used to detect dyes, luminescent groups and fluorescent groups. Biotin may be detected using avidin, coupled to a different reporter group (commonly a radioactive or fluorescent group or an enzyme). Enzyme reporter groups may generally be detected by the addition of substrate (generally for a specific period of time), followed by spectroscopic or other analysis of the reaction products.

In order to utilize the diagnostic assay kit of the present invention to determine the presence or absence of a cancer, such as prostate cancer, the signal detected from the reporter group that remains bound to the solid support would generally be compared to a

signal that corresponds to a predetermined cut-off value. For example, an illustrative cut-off value for the detection of a cancer may be the average mean signal obtained when the immobilized antibody is incubated with samples from patients without the cancer. In general, a sample generating a signal that is about three standard deviations above the predetermined cut-off value would be considered positive for the cancer. In an alternate embodiment, the cut-off value might be determined by using a Receiver Operator Curve, according to the method of Sackett *et al.*, Clinical Epidemiology. A Basic Science for Clinical Medicine, Little Brown and Co., 1985, p. 106-7. In such an embodiment, the cut-off value could be determined from a plot of pairs of true positive rates (i.e., sensitivity) and false positive rates (100 percent-specificity) that correspond to each possible cut-off value for the diagnostic test result. The cut-off value on the plot that is the closest to the upper left-hand corner (i.e., the value that encloses the largest area) is the most accurate cut-off value, and a sample generating a signal that is higher than the cut-off value determined by this method may be considered positive. Alternatively, the cut-off value may be shifted to the left along the plot, to minimize the false positive rate, or to the right, to minimize the false negative rate. In general, a sample generating a signal that is higher than the cut-off value determined by this method is considered positive for a cancer.

It is contemplated that the diagnostic assay enabled by the kit will be performed in either a flow-through or strip test format, wherein the binding agent is immobilized on a membrane, such as nitrocellulose. In the flow-through test, polypeptides within the sample bind to the immobilized binding agent as the sample passes through the membrane. A second, labeled binding agent then binds to the binding agent-polypeptide complex as a solution containing the second binding agent flows through the membrane. The detection of bound second binding agent may then be performed as described above. In the strip test format, one end of the membrane to which binding agent is bound will be immersed in a solution containing the sample. The sample migrates along the membrane through a region containing second binding agent and to the area of immobilized binding agent. Concentration of the second binding agent at the area of immobilized antibody indicates the presence of a cancer. Generation of a pattern, such as a line, at the binding site, which can be read visually, will be indicative of a positive test. The absence of such a pattern indicates a negative result. In general, the amount of binding agent immobilized on the membrane is

selected to generate a visually discernible pattern when the biological sample contains a level of polypeptide that would be sufficient to generate a positive signal in the two-antibody sandwich assay, in the format discussed above. Preferred binding agents for use in the instant diagnostic assay are the instantly disclosed antibodies, antigen-binding fragments thereof, and any CDMAB related binding agents as herein described. The amount of antibody immobilized on the membrane will be any amount effective to produce a diagnostic assay, and may range from about 25 nanograms to about 1 microgram. Typically such tests may be performed with a very small amount of biological sample.

Additionally, the CDMAB of the present invention may be used in the laboratory for research due to its ability to identify its target antigen.

In order that the invention herein described may be more fully understood, the following description is set forth.

The present invention provides CDMAB (i.e., IDAC 141205-05 CDMAB, a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produeced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, antigen binding fragments, or antibody ligands thereof) which specifically recognize and bind the IDAC 141205-05 antigen.

The CDMAB of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 may be in any form as long as it has an antigen-binding region which competitively inhibits the immunospecific binding of the isolated monoclonal antibody produced by hybridoma IDAC 141205-05 to its target antigen. Thus, any recombinant proteins (e.g., fusion proteins wherein the antibody is combined with a second protein such as a lymphokine or a tumor inhibitory growth factor) having the same binding specificity as the IDAC 141205-05 antibody fall within the scope of this invention.

In one embodiment of the invention, the CDMAB is the IDAC 141205-05 antibody.

In other embodiments, the CDMAB is an antigen binding fragment which may be a Fv molecule (such as a single-chain Fv molecule), a Fab molecule, a Fab' molecule, a F(ab')2 molecule, a fusion protein, a bispecific antibody, a heteroantibody or any recombinant molecule having the antigen-binding region of the IDAC 141205-05 antibody. The CDMAB

of the invention is directed to the epitope to which the IDAC 141205-05 monoclonal antibody is directed.

The CDMAB of the invention may be modified, i.e., by amino acid modifications within the molecule, so as to produce derivative molecules. Chemical modification may also be possible. Modification by direct mutation, methods of affinity maturation, phage display or chain shuffling may also be possible.

Affinity and specificity can be modified or improved by mutating CDR and/or phenylalanine tryptophan (FW) residues and screening for antigen binding sites having the desired characteristics (e.g., Yang *et al.*, J. Mol. Biol., (1995) 254: 392-403). One way is to randomize individual residues or combinations of residues so that in a population of otherwise identical antigen binding sites, subsets of from two to twenty amino acids are found at particular positions. Alternatively, mutations can be induced over a range of residues by error prone PCR methods (e.g., Hawkins *et al.*, J. Mol. Biol., (1992) 226: 889-96). In another example, phage display vectors containing heavy and light chain variable region genes can be propagated in mutator strains of *E. coli* (e.g., Low *et al.*, J. Mol. Biol., (1996) 250: 359-68). These methods of mutagenesis are illustrative of the many methods known to one of skill in the art.

Another manner for increasing affinity of the antibodies of the present invention is to carry out chain shuffling, where the heavy or light chain are randomly paired with other heavy or light chains to prepare an antibody with higher affinity. The various CDRs of the antibodies may also be shuffled with the corresponding CDRs in other antibodies.

Derivative molecules would retain the functional property of the polypeptide, namely, the molecule having such substitutions will still permit the binding of the polypeptide to the IDAC 141205-05 antigen or portions thereof.

These amino acid substitutions include, but are not necessarily limited to, amino acid substitutions known in the art as "conservative".

For example, it is a well-established principle of protein chemistry that certain amino acid substitutions, entitled "conservative amino acid substitutions," can frequently be made in a protein without altering either the conformation or the function of the protein.

Such changes include substituting any of isoleucine (I), valine (V), and leucine (L) for any other of these hydrophobic amino acids; aspartic acid (D) for glutamic acid (E) and vice versa; glutamine (Q) for asparagine (N) and vice versa; and serine (S) for threonine (T) and vice versa. Other substitutions can also be considered conservative, depending on the environment of the particular amino acid and its role in the three-dimensional structure of the protein. For example, glycine (G) and alanine (A) can frequently be interchangeable, as can alanine and valine (V). Methionine (M), which is relatively hydrophobic, can frequently be interchanged with leucine and isoleucine, and sometimes with valine. Lysine (K) and arginine (R) are frequently interchangeable in locations in which the significant feature of the amino acid residue is its charge and the differing pK's of these two amino acid residues are not significant. Still other changes can be considered "conservative" in particular environments.

EXAMPLE 1

In vivo Tumor Experiment with human MDA-MB-231 Breast Cancer Cells

AR47A6.4.2 had previously demonstrated (as disclosed in S.N. 11/709,676) efficacy in a MCF-7 human breast cancer xenograft model. To extend this finding AR47A6.4.2 was tested in a MDA-MB-231 human breast cancer xenograft model which differs from the MCF-7 model and is Her2/neu negative, estrogen and progesterone receptor negative. With reference to Figures 1, 2 and 3, 8 to 10 week old female SCID mice were implanted with 5 million human breast cancer cells (MDA-MB-231) in 100 microliters PBS solution injected subcutaneously in the right flank of each mouse. The mice were randomly divided into 2 treatment groups of 10. One day after implantation, 20 mg/kg of AR47A6.4.2 test antibody or buffer control was administered intraperitoneally to each cohort in a volume of 300 microliters after dilution from the stock concentration with a diluent that contained 2.7 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl and 20 mM Na_2HPO_4. The antibody and control samples were then administered once per week for the first two weeks and twice per week for another 3 weeks. Tumor growth was measured once per week with calipers. The treatment was completed after 8 doses of antibody. Body weights of the animals were recorded at the same time as tumor measurement. All animals were euthanized according to CCAC guidelines at the end of the study once they had reached endpoint.

AR47A6.4.2 significantly inhibited tumor growth in the MDA-MB-231 *in vivo* prophylactic model of human breast cancer. Treatment with ARIUS antibody AR47A6.4.2

reduced the growth of MDA-MB-231 tumors by 91.9 percent ($p<0.00001$, t-test), compared to the buffer treated group, as determined on day 55, 5 days after the last dose of antibody (Figure 1). All mice in the control group were removed from the study, due to reaching endpoint, at day 108, 58 days after the last dose of antibody. However, 90 percent of the mice in AR47A6.4.2-treated group were still alive at that time (Figure 2).

There were no obvious clinical signs of toxicity throughout the study. Body weight measured at weekly intervals was a surrogate for well-being and failure to thrive. The mean body weight increased in all groups over the duration of the study (Figure 3). The mean weight gain between day 0 and day 55 was 1.3 g (6.9 percent) in the control group and 1.8 g (9.3 percent) in the AR47A6.4.2-treated group. There were no significant differences between the groups during the treatment period. In summary, AR47A6.4.2 was well-tolerated and significantly inhibited the tumor growth in a human breast cancer xenograft model.

EXAMPLE 2

In vivo Tumor Experiment with human PL45 Pancreatic Cancer Cells

AR47A6.4.2 had previously demonstrated (as disclosed in S.N. 11/709,676) efficacy in a preventative PL45 human pancreatic cancer xenograft model. To determine effective dose levels AR47A6.4.2 was tested in an established PL45 model at various doses. With reference to Figures 4, 5, and 6, 8 to 10 week old female SCID mice were implanted with 4 million human pancreatic cancer cells (PL45) in 100 microliters PBS solution injected subcutaneously in the scruff of the neck. The mice were randomly divided into 5 treatment groups of 10 when the average mouse tumor volume reached approximately 100 mm^3. On day 32 after implantation, 20, 10, 2, or 0.2 mg/kg of AR47A6.4.2 test antibody or buffer control was administered intraperitoneally to each cohort in a volume of 300 microliters after dilution from the stock concentration with a diluent that contained 2.7 mM KCl, 1 mM KH_2PO_4, 137 mM NaCl and 20 mM Na_2HPO_4. The antibody and control samples were then administered three times per week for the duration of the study. Tumor growth was measured about every 4-7 days with calipers. The study was completed after 10 doses of antibody. Body weights of the animals were recorded once per week for the duration of the study. All animals were euthanized according to CCAC guidelines at the end of the study once they had reached endpoint.

AR47A6.4.2 demonstrated dose-dependent tumor growth inhibition in the PL45 *in vivo* established model of human pancreatic cancer. Treatment with ARIUS antibody AR47A6.4.2 reduced the growth of PL45 tumors by 48.9 percent (p=0.0001, t-test), 34.6 percent (p=0.0011, t-test), 17.4 percent (p=0.1938, t-test) and 4.7 percent (p=0.7065, t-test) at a dose of 20, 10, 2 and 0.2 mg/kg respectively, compared to the buffer treated group, as determined at day 67, 14 days after last dose of treatment (Figure 4). This was when almost all mice in the control and antibody-treated groups were still alive. The survival for all groups was monitored until day 88, 35 days after the last dose of treatment. At this time point, only 20 percent (2/10) of the mice in the control group were still alive while 60 percent (6/10), 40 percent (4/10) and 90 percent (9/10) of the mice in the AR47A6.4.2-treated group at doses of 20, 10, and 2 mg/kg respectively were still alive (Figure 5).

There were no obvious clinical signs of toxicity throughout the study. Body weight measured at weekly intervals was a surrogate for well-being and failure to thrive. The mean body weight increased in all groups over the duration of the study (Figure 6). The mean weight gain between day 32 and day 67 was 0.8 g (4.1 percent) in the control group and 1.5 g (7.6 percent), 1.5 g (7.6 percent), 1.2 g (6.3 percent) or 1.9 g (9.5 percent) in the AR47A6.4.2-treated group at doses of 20, 10, 2 and 0.2 mg/kg, respectively. There was no significant difference between the groups during the treatment period.

In summary, AR47A6.4.2 was well-tolerated and significantly inhibited the tumor growth in a dose dependent manner in this established human pancreatic cancer xenograft model at 20 and 10 mg/kg. Mice in the AR47A6.4.2-treated group at doses greater than 2 mg/kg also demonstrated a significant survival benefit. *In toto*, this data demonstrates that AR47A6.4.2 is effective in the treatment of human cancer in a dose dependent manner.

EXAMPLE 3

Human Normal and Multi-Tumor Tissue Staining

Additional IHC studies (previous studies were disclosed in S.N.11/709,676) were conducted to further characterize the AR47A6.4.2 antigen prevalence in human cancers. Slides were transferred from – 80°C to – 20°C. After one hour, the slides were postfixed for 10 minutes in cold (-20°C) acetone and then allowed to come to room temperature. Slides were rinsed in 4°C cold phosphate buffered saline (PBS) 3 times for 2 minutes each followed by blocking endogenous peroxidase activity with washing in 3 percent hydrogen peroxide for

10 minutes. Slides were then rinsed in PBS 3 times for 5 minutes followed by incubation in Universal blocking solution (Dako, Toronto, Ontario) for 5 minutes at room temperature. AR47A6.4.2, anti-human muscle actin (Clone HHF35, Dako, Toronto, Ontario), anti-cytokeratin 7 clone OV-TL 12/30 (Dako, Toronto, Ontario), anti-TROP-2 clone 77220.11 (R&D System Inc., MN, USA) or isotype control antibody (directed towards *Aspergillus niger* glucose oxidase, an enzyme which is neither present nor inducible in mammalian tissues; Dako, Toronto, Ontario) were diluted in antibody dilution buffer (Dako, Toronto, Ontario) to its working concentration of 5 micrograms/mL for each antibody, except for anti-actin which was 0.5 microgram/mL, anti-cytokeratin 7 was ready to use and commercial anti-TROP-2 was 1 microgram/mL, and incubated for 1 hour at room temperature. The slides were washed with PBS 3 times for 2 minutes each. Immunoreactivity of the primary antibodies was detected/visualized with HRP conjugated secondary antibodies as supplied (Dako Envision System, Toronto, Ontario) for 30 minutes at room temperature. Following this step the slides were washed with PBS 3 times for 5 minutes each and a color reaction developed by adding DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrachloride, Dako, Toronto, Ontario) chromogen substrate solution for immunoperoxidase staining for 10 minutes at room temperature. Washing the slides in tap water terminated the chromogenic reaction. Following counterstaining with Meyer's Hematoxylin (Sigma Diagnostics, Oakville, ON), the slides were dehydrated with graded ethanols (75-100 percent) and cleared with xylene. Using mounting media (Dako Faramount, Toronto, Ontario) the slides were coverslipped. For the pancreatic array (Tri Star, Rockville, MD) the same protocol was followed except for the following modifications. The tissue sections were initially air dried at room temperature for 2 hours and air dried again for 30 minutes after fixation with acetone. The endogenous hydrogen peroxide was blocked using 3 percent hydrogen peroxide in methanol for 15 minutes; this step was done after the primary antibody incubation.

Slides were microscopically examined using an Axiovert 200 (Ziess Canada, Toronto, ON) and digital images acquired and stored using Northern Eclipse Imaging Software (Mississauga, ON). Results were read, scored and interpreted by a histopathologist.

Figure 7 presents a summary of the results of AR47A6.4.2 staining of panels of human tumors and corresponding normal tissues (11 colon cancers and 2 normal colon, 8 ovarian cancers and 2 normal ovary, 12 breast cancers and 4 normal breast, 15 lung cancers

and 4 normal lung, 14 prostate cancers and 4 normal prostate and 14 pancreatic cancers and 5 normal pancreas). These tissues were distributed on four tissue microarrays (Tri Star, Rockville, MD). The antibody showed moderate to strong binding to 6/11 (55 percent), 6/8 (75 percent), 11/12 (92 percent), 12/15 (80 percent), 14/14 (100 percent) and 3/14 (21 percent) of colon, ovarian, breast, lung, prostate and pancreatic cancers, respectively (Figures 8 and 9). In addition, equivocal to weak binding was observed in 2/11 (18 percent), 1/12 (8 percent), 3/15 (20 percent) and 2/14 (14 percent) to colon, breast, lung and pancreatic cancers, respectively. The binding was specific to tumor cells in all tested tumors with over expression in tumors versus normal in some tissues. For corresponding normal tissues the antibody showed binding to 0/2, 0/2, 4/4, 4/4, 4/4 and 5/5 of normal colon, ovary, breast, lung, prostate and pancreatic tissues (Figure 9). The binding was predominantly to epithelial tissues of those organs. Anti-cytokeratin-7 or anti-actin, used as a positive antibody control, showed the expected positive binding to epithelial tissues and muscular tissues, respectively. The IgG isotype negative control showed negative binding to the tested tissues.

EXAMPLE 4

Phospho-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) Proteome Profiler Blots

To identify intracellular signaling molecules affected by AR47A6.4.2 treatment, lysates from cells treated with AR47A6.4.2 were screened using a proteome profiler human phospho-MAPK antibody array (ARY002, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN).

Treatment and preparation of cells

Previous work (as disclosed in S.N. 11/709,676) demonstrated *in vivo* efficacy of AR47A6.4.2 in a pancreatic cancer xenograft model using BxPC-3 cells grown in severe combined immunodeficient (SCID) mice. Accordingly, screening for activation of intracellular signaling molecules was done using the BxPC-3 cell line. BxPC-3 cells were grown to near confluence, washed with phosphate buffered saline (PBS) and then starved in serum and supplement–deficient media for 4 hours at 37°C. After this, AR47A6.4.2 (20 micrograms/mL) or 8A3B.6 (isotype control; IgG2a) (20 micrograms/mL) was added to the cells and allowed to bind for 20 minutes at 4°C. Cells were then stimulated by adding fetal bovine serum (FBS), L-glutamine and sodium pyruvate to the cells to give a final

concentration of 10 percent FBS, 1 percent L-glutamine, and 1 percent sodium pyruvate. The cells were placed in an incubator at 37°C and the cell lysate was collected 1 hour after stimulation. Lysates were collected by washing the cells twice with PBS and harvesting in lysis buffer 6 (Part no. 895561: R&D Systems antibody array ARY002). The cells were resuspended by pipetting, transferred to a 1.5 mL microfuge tube and mixed by rotation at 4°C for 30 minutes. Lysates were then centrifuged at 14000xg for five minutes and the supernatant was transferred to a clean tube. Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce, Rockford, IL).

Human phospho-MAPK antibody array

The human phospho-MAPK antibody array was screened against BxPC-3 cell lysates according to the protocol described by the manufacturer (Fourth Revision, May 2006, R&D Systems antibody array ARY002). Briefly, each human phospho-MAPK profiler membrane was prepared by incubating in 1.5 mL of array buffer 1 (Part no. 895477: R&D Systems antibody array ARY002) for 1 hour on a rocking platform shaker. For each treatment, 150 micrograms of total protein was diluted with lysis buffer 6 to give a final volume of 250 microliters and mixed with 1.25 mL of array buffer 1. This mixture was added to the prepared profiler membranes and incubated at 4°C overnight on a rocking platform shaker. Each membrane was then washed 3 times in 1X wash buffer (diluted in purified distilled water from a 25X stock, (Part no. 895003: R&D Systems antibody array ARY002)) and incubated for 2 hours with 1.5 mL of anti-phospho-MAPK detection antibody cocktail (containing biotinylated phospho-specific antibodies) (Part no. 893051: R&D Systems antibody array ARY002) prepared in 1X array buffer 2/3 (5X array buffer 2, Part no. 895478: R&D Systems antibody array ARY002; array buffer 3, Part no. 895008: R&D Systems antibody array ARY002). The membranes were washed 3 times in 1X wash buffer and incubated for 30 minutes with 1.5 mL of Streptavidin-HRP (Part no. 890803: R&D Systems antibody array ARY002) diluted 1:2000 in 1X array buffer 2/3. The membranes were washed 3 times in 1X wash buffer and exposed to ECL plus Western detection reagents (GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ) for developing. Membranes were exposed to chemiluminescent film (Kodak, Rochester, NY) and developed using an X-ray medical processor. Phospho-MAPK array data on developed X-ray films were quantitated by scanning the film on a transmission-mode scanner and analyzing the array image file using

Image J analysis software (Image J 1.37v, NIH). For each kinase, the average pixel density for corresponding duplicate spots was calculated and subtracted from background signal using the pixel density of a clear area on the membrane. The average normalized pixel density of AR47A6.4.2-treated samples was divided by the average normalized pixel density of 8A3B.6-treated samples for each corresponding phospho-protein target to obtain a ratio of relative change. The percent reduction of phospho-protein signal was determined by subtracting the ratio of relative change from 1 and multiplying by 100.

The result from phospho-MAPK array membranes incubated with AR47A6.4.2 or 8A3B.6 is shown in Figure 10. Compared with 8A3B.6, AR47A6.4.2 suppressed the phosphorylation of p42/p44 MAPK/extracellular signal-regulated kinases (ERK) (ERK1 (32 percent) and ERK2 (20 percent), Akt/ protein kinase B (PKB) (Akt1/PKBalpha (15 percent), Akt2/PKBbeta (18 percent) and Akt3/PKBgamma (27 percent)) in BxPC-3 cells stimulated with serum and supplements. These kinases are involved in intracellular signaling pathways that can affect cell proliferation, growth and survival. That AR47A6.4.2 can reduce the phosphorylation of these kinases upon stimulation by serum and supplements suggest that AR47A6.4.2 may block cell growth and survival of cancer cells through these kinases and their related intracellular signaling pathways.

EXAMPLE 5

TranSignal™ Angiogenesis Antibody Array of Conditioned Media

To determine whether AR47A6.4.2 treatment can affect secretion of angiogenic factors, conditioned media from cells treated with AR47A6.4.2 were screened using an anangiogenesis array (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA).

Treatment and preparation of cells

As disclosed in S.N. 11/709,676, *in vivo* efficacy of AR47A6.4.2 was demonstrated in a pancreatic cancer xenograft model using BxPC-3 cells grown in severe combined immunodeficient (SCID) mice. Accordingly, screening for secretion of angiogenic factors was performed using the BxPC-3 cell line. BxPC-3 cells were grown to near confluence, washed with phosphate buffered saline (PBS) and then replenished with 2 mL of serum-deficient media. AR47A6.4.2 (20 micrograms/mL) or 8A3B.6 (isotype control; IgG2a) (20 micrograms/mL) was added to the cells and allowed to bind for 20 minutes at 4°C. The cells were placed in an incubator at 37°C for 24 hours. After 24 hours, the conditioned media

from each culture was collected and centrifuged at 1200 revolutions per minute (rpm) for 5 minutes to remove cells or cell debris.

TranSignal™ Angiogenesis Antibody Array

TranSignal™ angiogenesis antibody arrays were screened with BxPC-3 cell conditioned media according to the protocol described by the manufacturer (Released 10/07/03, Revised 08/03/05; MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA). Briefly, each TranSignal™ angiogenesis antibody array membrane was prepared by incubating in 3 mL of 1X Blocking Buffer (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA) for 1 hour at room temperature on a rocking platform shaker. The membranes were then washed twice with 4 mL of 1X Wash Buffer II (20X Wash Buffer II diluted to 1X with distilled water (dH_20), MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA). After washing, the entire conditioned media collected (2 mL) was added to a membrane and incubated overnight at 4°C on a rocking platform shaker. The membranes were then washed 3X using 4 mL of 1X Wash Buffer I (20X wash Buffer diluted to 1X in dH_20, MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA). This was followed by 3 washes with 4 mL of 1X Wash Buffer II (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA). The membranes were then incubated for 1 hour in 1.5 mL of Biotin-Conjugated Anti-Angiogenesis Mix (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA) on a rocking platform shaker, washed 3X using 4 mL of 1X Wash Bufffer I (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA) followed by 3 washes with 4 mL of 1X Wash Buffer II (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA). Strepavidin-HRP, diluted 1:1000 in 1X Wash Buffer II, was added to the membranes and incubated for 1 hour at room temperature, washed again 3X using 4 mL of 1X Wash Bufffer I (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA) followed by 3 washes with 4 mL of 1X Wash Buffer II (MA6310, Panomics Inc., Redwood City, CA) and developed using Hyperfilm™ ECL reagent (RPN3114K, GE Healthcare, Life Sciences, Piscataway, NJ). The membranes were exposed to chemiluminescent film (Kodak, Rochester, NY) and developed using an X-ray medical processor. Angiogenesis array data on developed X-ray films were quantitated by scanning the film on a transmission-mode scanner and analyzing the array image file using Image J analysis software (Image J 1.37v, NIH). For each secreted factor, the average pixel density for corresponding duplicate spots was calculated and subtracted from background signal using the pixel density of a clear area on the membrane. The average normalized pixel density of AR47A6.4.2-treated samples was divided by the

average normalized pixel density of 8A3B.6-treated samples for each corresponding target to obtain a ratio of relative change. The percent reduction of signal was determined by subtracting the ratio of relative change from 1 and multiplying by 100.

The results from TranSignal™ angiogenesis antibody array membranes incubated with AR47A6.4.2 or 8A3B.6 are shown in Figure 11. Compared with 8A3B.6, AR47A6.4.2 suppressed the secretion of the potent angiogenic factors vascular endothelial growth factor (VEGF) and placental growth factor (PLGF). This observation suggests that treatment of the BxPC-3 pancreatic cancer cell line with AR47A6.4.2 may result in the inhibition of tumor growth and survival of the cancer cells by reducing the secretion of factors by the cells that promote blood vessel growth in solid tumors. This finding demonstrates a possible mechanism of action for AR47A6.4.2.

EXAMPLE 6

Demonstration of *in vitro* Complement-Dependent Cytotoxicity (CDC) activity of the Anti-TROP-2 antibody AR47A6.4.2

Therapeutic efficacy of murine AR47A6.4.2 has been previously demonstrated in xenograft tumor models of human pancreatic cancer (as disclosed in S.N. 11/709,676 and in Example 2 above). In order to elucidate its mechanisms of action, AR47A6.4.2 was evaluated *in vitro* for CDC activity on two pancreatic cancer cell lines, PL45 and BxPC-3. Established monolayers of PL45 and BxPC-3 cells, two days post plating, were treated with antibody (2, 0.2 and 0.02 micrograms/mL) and allowed to bind for one hour (37° C; 4 percent CO_2). Rabbit complement was then added to yield a final concentration of 10 percent (v/v) and cells were allowed to incubate for an additional 3 hours at 37 °C, 4 percent CO_2. CDC activity was evaluated by measuring the residual lactate dehydrogenase present in uncompromised cells using the Cytotox 96™ kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA). Each test antibody was evaluated in triplicate and the results were expressed as percent cytotoxicity, as compared to rabbit complement only treated wells, using the following equation: percent Cytotoxicity = 100-[Test Antibody$_{(492nm)}$-Background$_{(492nm)}$]/Complement Only$_{(492nm)}$ - Background$_{(492nm)}$]*100.

The results from this experiment (Figure 12) demonstrate that the anti-TROP-2 antibody AR47A6.4.2 was capable of recruiting rabbit complement in a dose-dependent manner in both pancreatic cancer target cell lines (PL45 and BxPC-3). CDC activity was not

observed in these cell lines when treated with isotype-matched control at the highest concentration (20 micrograms/mL). This data demonstrates that AR47A6.4.2 is capable of complement recruitment *in vitro* and may be one of the mechanisms by which this antibody is exerting its effects *in vivo*.

EXAMPLE 7

Epitope Mapping

Epitope mapping experiments were carried out in order to determine the region(s) of the TROP-2 molecule that are recognized by AR47A6.4.2. Overlapping 15-mer peptides were synthesized based on the amino acid sequence of TROP-2 using standard Fmoc-chemistry and deprotected using trifluoric acid with scavengers. Additionally, up to 30-mer double-looped, triple-looped and sheet-like peptides were synthesized on chemical scaffolds in order to reconstruct discontinuous epitopes of the TROP-2 molecule, using Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS) technology. The looped peptides were synthesized containing a dicysteine, which was cyclized by treating with alpha,alpha'-dibromoxylene and the size of the loop was varied by introducing cysteine residues at variable spacing. If other cysteines besides the newly introduced cysteines were present, they were replaced by an alanine. The side-chains of the multiple cysteines in the peptides were coupled to CLIPS templates by reacting onto credit-card format polypropylene PEPSCAN cards (455 peptide formats/card) with an 0.5 mM solution of CLIPS template such as 1,3-bis (bromomethyl) benzene in ammonium bicarbonate (20 mM, pH 7.9)/acetonitrile (1:1 (v/v)). The cards were gently shaken in the solution for 30 to 60 minutes while completely covered in solution. Finally, the cards were washed extensively with excess H_2O and sonicated in disrupt-buffer containing 1 percent SDS/0.1 percent beta-mercaptoethanol in PBS (pH 7.2) at 70°C for 30 minutes, followed by sonication in H_2O for another 45 minutes. In total, 3579 different peptides were synthesized. The binding of antibody to each peptide was tested in a PEPSCAN-based ELISA. The 455-well credit card format polypropylene cards containing the covalently linked peptides were incubated with primary antibody solution consisting of 10 micrograms/mL of AR47A6.4.2 diluted in blocking solution (5% horse-serum (v/v), 5% ovalbumin (w/v) and 1% Tween 80 in PBS) overnight. After washing with PBS containing 1% Tween 80, the peptides were incubated with a 1/1000 dilution of rabbit anti-mouse

antibody peroxidase in blocking solution (5 percent horse-serum (v/v), 5 percent ovalbumin (w/v) and Tween 80 in PBS) for one hour at 25°C. After washing with PBS containing 1 percent Tween 80, the peroxidase substrate 2,2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline sulfonate (ABTS) and 2 microliters of 3 percent H_2O_2 were added. After one hour, the color development was measured. The color development was quantified on a logarithmic scale of 0 to 4000 with a charge coupled device (CCD)-camera and an image processing system.

The twenty peptides (out of 3579) to which AR47A6.4.2 bound most strongly are listed in Figure 13. Two amino acid hotspots were identified by analyzing the composition of the peptides to which AR47A6.4.2 bound. The hotspot amino acid sequence LFRERYRLH (SEQ ID NO: 11) is present in peptide numbers 1, 2, 7, 8, 12, 16, 17 and 18 and the hotspot amino acid sequence QVERTL1YY (SEQ 1D NO: 12) is present in peptide numbers 11 and 20. Peptides 3-6, 10, 14, 15 and 19 most likely represent an epitope mimic, as the sequence of these peptides falls within the intracellular portion of the TROP-2 molecule. Overall these results indicate that AR47A6.4.2 recognizes a discontinuous epitope consisting of sequences around LFRERYRLH (SEQ 1D NO: 11) and QVERTLIYY (SEQ ID NO: 12). The position of these amino acid sequences within the entire TROP-2 molecule amino acid sequence is presented in Figure 14.

EXAMPLE 8

Humanization of AR47A6.4.2

Recombinant DNA techniques were performed using methods well known in the art and, as appropriate, supplier instructions for use of enzymes used in these methods. Detailed laboratory methods are also described below.

mRNA was extracted from the hybridoma AR47A6.4.2 cells using a Poly A Tract System 1000 mRNA extraction kit: (Promega Corp., Madison, W1) according to manufacturer's instructions. mRNA was reverse transcribed as follows: For the kappa light chain, 5.0 microliters of mRNA was mixed with 1.0 microliter of 20 pmol/ microliter MuIgGκV_L-3' primer OL040 (Figure 15) and 5.5 microliters nuclease free water (Promega Corp., Madison, WI). For the lambda light chain, 5.0 microliters of mRNA was mixed with 1.0 microliter of 20 pmol/ microliter MuIgGλV_L-3' primer OL042 (Figure 15) and 5.5 microliters nuclease free water (Promega Corp., Madison, WI). For the gamma heavy chain,

5 microliters of mRNA was mixed with 1.0 microliter of 20 pmol/ microliter MuIgGV_H-3' primer OL023 (Figure 16) and 5.5 microliter nuclease free water (Promega Corp., Madison, WI). All three reaction mixes were placed in the pre-heated block of the thermal cycler set at 70°C for 5 minutes. These were chilled on ice for 5 minutes before adding to each 4.0 microliters ImPromII 5x reaction buffer (Promega Corp., Madison, WI), 0.5 microliters RNasin ribonuclease inhibitor (Promega Corp., Madison, WI), 2.0 microliters 25mM $MgCl_2$ (Promega Corp., Madison, WI), 1.0 microliter 10mM dNTP mix (Invitrogen, Paisley, UK) and 1.0 microliter Improm II reverse transcriptase (Promega Corp., Madison, WI). The reaction mixes were incubated at room temperature for 5 minutes before being transferred to a pre-heated PCR block set at 42°C for 1 hour. After this time the reverse transcriptase was heat inactivated by incubating at 70°C in a PCR block for fifteen minutes.

Heavy and light chain sequences were amplified from cDNA as follows: A PCR master mix was prepared by adding 37.5 microliters 10x Hi-Fi Expand PCR buffer: (Roche, Mannheim, Germany), 7.5 microliters 10mM dNTP mix (Invitrogen, Paisley, UK) and 3.75 microliters Hi-Fi Expand DNA polymerase (Roche, Mannheim, Germany) to 273.75 microliters nuclease free water. This master mix was dispensed in 21.5 microliter aliquots into 15 thin walled PCR reaction tubes on ice. Into six of these tubes was added 2.5 microliters of MuIgVH-3' reverse transcription reaction mix and 1.0 microliter of heavy chain 5' primer pools HA to HF (see Figure 16 for primer sequences and primer pool constituents). To another seven tubes was added 2.5 microliters of MuIgKVL-3' reverse transcripton reaction and 1.0 microliter of light chain 5' primer pools LA to LG (Figure 15). Into the final tube was added 2.5 microliters of MuIgKVL-3' reverse transcripton reaction and 1.0 microliter of lambda light chain primer MuIgλVL5'-LI. Reactions were placed in the block of the thermal cycler and heated to 95°C for 2 minutes. The polymerase chain reaction (PCR) reaction was performed for 40 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 1 minute and 72°C for 30 seconds. Finally the PCR products were heated at 72°C for 5 minutes, and then held at 4°C.

Amplification products were cloned into pGEM-T easy vector using the pGEM-T easy Vector System I (Promega Corp., Madison, WI) kit and sequenced. The resultant VH and VL sequences are shown in Figures 17 and 18 respectively.

For generation of a chimeric antibody, VH region genes were amplified by PCR using the primers OL334 and OL335 (Figure 19); these were designed in order to

engineer in a 5' MluI and a 3' HindIII restriction enzyme site using plasmid DNA from one of the cDNA clones as a template. Into a 0.5 mL PCR tube was added 5 microliters 10x Hi-Fi Expand PCR buffer: (Roche, Mannheim, Germany), 1.0 microliter 10mM dNTP mix (Invitrogen, Paisley, UK), 0.5 microliters of Primer OL330, 0.5 microliters of primer OL331, 1.0 microliter template DNA and 0.5 microliters Hi-Fi Expand DNA polymerase (Roche, Mannheim, Germany) to 41.5 microliters nuclease free water.

VL regions were amplified in a similar method using the oligonucleotides OL336 and OL337 (Figure 20) to engineer in BssHII and BamHI restriction enzyme sites. Reactions were placed in the block of the thermal cycler and heated to 95°C for 2 minutes. The polymerase chain reaction (PCR) reaction was performed for 30 cycles of 94°C for 30 seconds, 55°C for 1 minute and 72°C for 30 seconds. Finally the PCR products were heated at 72°C for 5 minutes, and then held at 4°C. VH and VL region PCR products were then cloned into the vectors pANT15 and pANT13 respectively (Figure 21) at the MluI/HindIII and BssHII/BamHI sites respectively. Both pANT15 and pANT13 are pAT153-based plasmids containing a human Ig expression cassette. The heavy chain cassette in pANT15 consists of a human genomic IgG1 constant region gene driven by the hCMVie promoter, with a downstream human IgG polyA region. pANT15 also contains a hamster *dhfr* gene driven by the SV40 promoter with a downstream SV40 polyA region. The light chain cassette of pANT13 is comprised of the genomic human kappa constant region driven by the hCMVie promoter with downstream light chain polyA region. Cloning sites between a human Ig leader sequence and the constant regions allow for the insertion of the variable region genes.

NS0 cells (ECACC 85110503, Porton, UK) were co-transfected with these two plasmids via electroporation and selected in DMEM (Invitrogen, Paisley, UK) plus 5 percent FBS (Ultra low IgG Cat No. 16250-078 Invitrogen, Paisley, UK) plus Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Paisley, UK) plus 100 nM Methotrexate (Sigma, Poole, UK). Methotrexate resistant colonies were isolated and antibody was purified by Protein A affinity chromatography using a 1 mL HiTrap MabSelect SuRe column (GE Healthcare, Amersham, UK) following the manufacturers recommended conditions.

The chimeric antibody was tested in an ELISA-based competition assay using AR47A6.4.2 mouse antibody, biotinylated using Biotintag micro biotinylation kit (Sigma, Poole, UK). Biotinylated mouse AR47A6.4.2 was used to bind OVCAR-3 cells in the

presence of varying concentrations of competing antibody. OVCAR-3 cells were cultured to near confluence in tissue culture treated, flat bottomed, 96 well plates and then fixed. Biotinylated mouse AR47A6.4.2 antibody was diluted to 1 microgram/mL and mixed with an equal volume of competing antibody at concentrations ranging from 0-5 micrograms/mL. 100 microliters of the antibody mixes were transferred into the wells of the OVCAR-3 coated plate and incubated at room temperature for 1 hour. The plate was washed, and bound biotinylated mouse AR47A6.4.2 was detected by adding a strepavidin-HRP conjugate (Sigma, Poole, UK) (diluted at 1:500) and OPD substrate (Sigma, Poole, UK). The assay was developed in the dark for 5 minutes before being stopped by the addition of 3 M HCl. The assay plate was then read in a MRX TCII plate reader (Dynex Technologies, Worthing, UK) at an absorbance of 490nm. The chimeric antibody ((ch)AR47A6.4.2) was shown to be equivalent to the mouse AR47A6.4.2 antibody in competing with biotinylated AR47A6.4.2 antibody for binding to OVCAR-3 cells.

Humanized VH and VL sequences were designed by comparison of mouse AR47A6.4.2 sequences and homologous human VH and VL sequences. Sequences of the VH variants are given in Figure 22 and of the VL variants in Figure 23. Humanized V region genes were constructed using the mouse AR47A6.4.2 VH and VL templates for PCR using long overlapping oligonucleotides to introduce amino acids from homologous human VH and VL sequences. Oligonucleotides used for the generation of variant humanized VH and VL sequences are shown in Figures 19 and 20 respectively. Variant genes were cloned directly into the expression vectors pSVgpt and pSVhyg as detailed in US2004260069 (Hellendoorn, Carr and Baker).

All combinations of variant humanized heavy and light chains (including the chimeric constructs) were transiently transfected into CHO-K1 cells (ECACC 85051005, Porton, UK) and supernatants harvested after 48 hours. The supernatants were quantified for antibody expression in a IgG Fc/Kappa ELISA using purified human IgG1/Kappa (Sigma, Poole, UK) as standards. Immunosorb 96 well plates (Nalge nunc, Hereford, UK) were coated with mouse anti-human IgG Fc-specific antibody (I6260 Sigma, Poole, UK) diluted at 1:1500 in 1X PBS (pH 7.4) at 37°C for 1 hour. Plates were washed three times in PBS + 0.05 percent Tween 20 before adding samples and standards, diluted in 2 percent BSA/PBS. Plates were incubated at room temperature for 1 hour before washing three times in PBS/Tween and

adding 100 microliters/well of detecting antibody goat anti-human kappa light chain peroxidase conjugate (A7164 Sigma, Poole, UK) diluted 1:1000 in 2 percent BSA/PBS. Plates were incubated at room temperature for 1 hour before washing five times with PBS/Tween. Bound antibody was detected using OPD substrate (Sigma, Poole, UK). The assay was developed in the dark for 5 minutes before being stopped by the addition of 3 M HCl. The assay plate was then read in a MRX TCII plate reader (Dynex Technologies, Worthing, UK) at 490 nm.

Binding of the humanized variants was assayed in the competition binding ELISA described above. A standard curve was generated with varying concentrations (156.25 ng/mL to 5 micrograms/mL) of purified chimeric antibody ((ch)AR47A6.4.2) competing for binding with mouse AR47A6.4.2 to fixed OVCAR-3 cells on a 96-well microtitre plate. Binding of mouse AR47A6.4.2 to OVCAR-3 cells was detected with goat anti-mouse IgG:HRP conjugate (A2179 Sigma, Poole, UK) and developed using TMB substrate (Sigma, Poole, UK) Using the chimeric standard curve, the percentage inhibition expected at the concentrations tested was calculated for each variant and compared to that actually observed. The results were then normalized by dividing the observed inhibition of the test sample by the expected inhibition for each of the various heavy/light chain combinations. Thus a sample with an observed/expected ratio = 1.0 has the same binding affinity as the chimeric antibody whereas a value >1.0 has reduced binding to TROP-2 and a sample with a ratio <1.0 has improved binding to TROP-2. The results are shown in Figure 24.

Combinations of VH and VL genes were cloned into the dual vector pANT18 (pANT 18 vector is based on the plasmid pANT15 described previously, with the light chain cassette from pANT13 cloned into the SpeI/PciI restriction enzyme sites) and transfected into CHO/dhfr- cells (ECACC, 94060607) by electroporation and selected in media (high glucose DMEM with L-glutamine and Na pyruvate (Invitrogen, Paisley UK) plus 5 percent dialysed FBS (Cat No. 26400-044 Invitrogen, Paisley, UK), Proline (Sigma, Poole, UK) and Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Paisley, UK) depleted of Hypoxanthine and Thymidine. Antibodies were purified by Protein A affinity chromatography as above. The purified antibodies were filter sterilized before storing (in PBS pH 7.4) at +4°C. The concentrations of the antibodies were calculated by human IgG1/kappa capture ELISA as above.

Four of the purified antibody samples were tested for binding to OVCAR-3 cells expressing human TROP-2 via a competition ELISA as above. Varying concentrations of each antibody (156 ng/mL to 5 micrograms/mL) were mixed with purified mouse AR47A6.4.2 and added to microtiter plates coated with fixed OVCAR-3 cells. Binding of mouse AR47A6.4.2 was detected with goat anti-mouse lgG (Fc):HRP conjugate as above. Absorbance at 450 nm was measured on a plate reader and this was plotted against the test antibody concentration. The concentration of selected variants required to inhibit mouse AR47A6.4.2 binding to OVCAR-3 cells by 50 percent (IC_{50}) was calculated and compared to the chimeric antibody.

The IC_{50} for the four variant humanized antibodies and the chimeric antibody are as follows:

(ch)AR47A6.4.2	= 1.71 micrograms/mL
(hu)AR47A6.4.2 variant HV2/KV3	= 2.24 micrograms/mL
(hu)AR47A6.4.2 variant HV2/KV4	= 3.04 micrograms/mL
(hu)AR47A6.4.2 variant HV3/KV3	= 2.04 micrograms/mL
(hu)AR47A6.4.2 variant HV3/KV4	= 1.02 micrograms/mL

EXAMPLE 9

Determination of the binding affinity of AR47A6.4.2 and (hu)AR47A.6.4.2 to rhTROP-2

The binding affinity of AR47A6.4.2, (hu)AR47A6.4.2 variant HV2/KV3, (hu)AR47A6.4.2 variant HV2/KV4, (hu)AR47A6.4.2 variant HV3/KV3 and (hu)AR47A6.4.2 variant HV3/KV4 was compared by the determination of the respective dissociation constants (K_D) subsequent to binding to recombinant human TROP-2 (rhTrop-2).

An anti-polyHistidine monoclonal antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was immobilized using the standard amine coupling procedure. The surface of a CM5 sensor chip (GE Healthcare, Piscataway, NJ USA formerly Biacore) was activated by injection of 104 microliters of a 1:1 mixture of 0.4M EDC and 0.1M NHS (flow rate 10 microliters/minute). The anti-polyHistidine antibody was injected at a concentration of 20 micrograms/mL (diluted in 10 mM sodium acetate pH 5.5) to reach approximately 2000 RU. Finally, 119 microliters of 1.0 M ethanolamine-HCL pH 8.5 was injected over the surface to block any unoccupied activated sites on the sensor chip surface. HIS-tagged rhTROP-2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) was injected at 1 microgram/mL and captured by

the HIS tag on the chip surface, followed by injection of AR47A6.4.2, (hu)AR47A6.4.2 variant HV2/KV3, (hu)AR47A6.4.2 variant HV2/KV4, (hu)AR47A6.4.2 variant HV3/KV3 or (hu)AR47A6.4.2 variant HV3/KV4. Regeneration of the sensor chip surface for subsequent injections was accomplished by injection of 10mM Glycine-HCl pH 2.0 for 60 seconds at a flow rate of 50 microliters/minute. Antibodies were diluted in running buffer (HBS-EP+, GE Healthcare, Piscataway, NJ USA formerly Biacore) and serially injected at concentrations ranging from 0.67 to 333 nM, and the surface was regenerated between each cycle. As a control, each antibody concentration was also injected over a reference surface, which had immobilized anti-polyHistidine antibody but did not have captured rhTROP-2 on the surface. Using Biacore T100 Evaluation Software Version 1.1, kinetic analysis was performed on the obtained sensograms using a simple 1:1 interaction model. The association and dissociation rate constants measured were used to calculate the KD of the antibodies. The experiments were conducted using a Biacore T100 system (GE Healthcare, Piscataway, NJ USA formerly Biacore). The results of these experiments yielded values of 3.03 nM for murine AR47A6.4.2 while all four (hu)AR47A6.4.2 were between 0.613 to 0.697 nM. (Figure 25), indicating that all of the antibodies are in the nanomolar to subnanomolar range, and that the affinities of the humanized antibodies are higher than that of the parental murine AR47A6.4.2. The association rate constants (Ka) and dissociation rate constants (Kd) were also tabulated (Figure 25).

EXAMPLE 10

Isolation of Competitive Binders

Given an antibody, an individual ordinarily skilled in the art can generate a competitively inhibiting CDMAB, for example a competing antibody, which is one that recognizes the same epitope (Belanger L *et al. Clinica Chimica Acta* 48:15-18 (1973)). One method entails immunizing with an immunogen that expresses the antigen recognized by the antibody. The sample may include but is not limited to tissues, isolated protein(s) or cell line(s). Resulting hybridomas could be screened using a competition assay, which is one that identifies antibodies that inhibit the binding of the test antibody, such as ELISA, FACS or Western blotting. Another method could make use of phage display antibody libraries and panning for antibodies that recognize at least one epitope of said antigen (Rubinstein JL *et al. Anal Biochem* 314:294-300 (2003)). In either case, antibodies are selected based on their

ability to displace the binding of the original labeled antibody to at least one epitope of its target antigen. Such antibodies would therefore possess the characteristic of recognizing at least one epitope of the antigen as the original antibody.

EXAMPLE 11

Cloning of the Variable Regions of the AR47A6.4.2 Monoclonal Antibody

The sequences of the variable regions from the heavy (V_H) and light (V_L) chains of monoclonal antibody produced by the AR47A6.4.2 hybridoma cell line were previously determined (as disclosed in S.N. 11/709,676). To generate chimeric and humanized IgG, the variable light and variable heavy domains can be subcloned into an appropriate vector for expression (as disclosed in Example 8 above).

In another embodiment, AR47A6.4.2 or its de-immunized, chimeric or humanized version is produced by expressing a nucleic acid encoding the antibody in a transgenic animal, such that the antibody is expressed and can be recovered. For example, the antibody can be expressed in a tissue specific manner that facilitates recovery and purification. In one such embodiment, an antibody of the invention is expressed in the mammary gland for secretion during lactation. Transgenic animals include but are not limited to mice, goat and rabbit.

(i) Monoclonal Antibody

DNA encoding the monoclonal antibody (as disclosed in S.N. 11/709,676) is readily isolated and sequenced using conventional procedures (e.g., by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of the monoclonal antibodies). The hybridoma cell serves as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as E. coli cells, simian COS cells, Chinese hamster ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce immunoglobulin protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences. Chimeric or hybrid antibodies also may be prepared *in vitro* using known methods in synthetic protein chemistry, including those involving crosslinking agents. For example, immunotoxins may be constructed using a

disulfide exchange reaction or by forming a thioether bond. Examples of suitable reagents for this purpose include iminothiolate and methyl-4-mercaptobutyrimidate.

(ii) Humanized Antibody

A humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a non-human source. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be performed using the method of Winter and co-workers by substituting rodent CDRs or CDR sequences for the corresponding sequences of a human antibody (Jones *et al.*, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, Science 239:1534-1536 (1988); reviewed in Clark, Immunol. Today 21:397-402 (2000)).

A humanized antibody can be prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, i.e. the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the consensus and import sequence so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the CDR residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

(iii) Antibody Fragments

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. These fragments can be produced by recombinant host cells (reviewed in Hudson, Curr. Opin. Immunol. 11:548-557 (1999); Little *et al.*, Immunol. Today 21:364-370 (2000)). For example, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form $F(ab')_2$ fragments (Carter *et al.*, Biotechnology 10:163-167 (1992)). In another embodiment, the $F(ab')_2$ is formed using the leucine zipper GCN4 to promote assembly of the $F(ab')_2$ molecule. According to another approach, Fv, Fab or $F(ab')_2$ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture.

EXAMPLE 12

A Composition Comprising the Antibody of the Present Invention

The antibody of the present invention can be used as a composition for preventing/treating cancer. The composition for preventing/treating cancer, which comprises the antibody of the present invention, can be administered as they are in the form of liquid preparations, or as pharmaceutical compositions of suitable preparations to human or mammals (e.g., rats, rabbits, sheep, swine, bovine, feline, canine, simian, etc.) orally or parenterally (e.g., intravascularly, intraperitoneally, subcutaneously, etc.). The antibody of the present invention may be administered in itself, or may be administered as an appropriate composition. The composition used for the administration may contain a pharmacologically acceptable carrier with the antibody of the present invention or its salt, a diluent or excipient. Such a composition is provided in the form of pharmaceutical preparations suitable for oral or parenteral administration.

Examples of the composition for parenteral administration are injectable preparations, suppositories, etc. The injectable preparations may include dosage forms such as intravenous, subcutaneous, intracutaneous and intramuscular injections, drip infusions, intraarticular injections, etc. These injectable preparations may be prepared by methods publicly known. For example, the injectable preparations may be prepared by dissolving, suspending or emulsifying the antibody of the present invention or its salt in a sterile aqueous medium or an oily medium conventionally used for injections. As the aqueous medium for injections, there are, for example, physiological saline, an isotonic solution containing glucose and other auxiliary agents, etc., which may be used in combination with an appropriate solubilizing agent such as an alcohol (e.g., ethanol), a polyalcohol (e.g., propylene glycol, polyethylene glycol), a nonionic surfactant (e.g., polysorbate 80, HCO-50 (polyoxyethylene (50 mols) adduct of hydrogenated castor oil)), etc. As the oily medium, there are employed, e.g., sesame oil, soybean oil, etc., which may be used in combination with a solubilizing agent such as benzyl benzoate, benzyl alcohol, etc. The injection thus prepared is usually filled in an appropriate ampoule. The suppository used for rectal administration may be prepared by blending the antibody of the present invention or its salt with conventional bases for suppositories. The composition for oral administration includes solid or liquid preparations, specifically, tablets (including dragees and film-coated tablets), pills, granules, powdery

preparations, capsules (including soft capsules), syrup, emulsions, suspensions, etc. Such a composition is manufactured by publicly known methods and may contain a vehicle, a diluent or excipient conventionally used in the field of pharmaceutical preparations. Examples of the vehicle or excipient for tablets are lactose, starch, sucrose, magnesium stearate, etc.

Advantageously, the compositions for oral or parenteral use described above are prepared into pharmaceutical preparations with a unit dose suited to fit a dose of the active ingredients. Such unit dose preparations include, for example, tablets, pills, capsules, injections (ampoules), suppositories, etc. The amount of the aforesaid compound contained is generally 5 to 500 mg per dosage unit form; it is preferred that the antibody described above is contained in about 5 to about 100 mg especially in the form of injection, and in 10 to 250 mg for the other forms.

The dose of the aforesaid prophylactic/therapeutic agent or regulator comprising the antibody of the present invention may vary depending upon subject to be administered, target disease, conditions, route of administration, etc. For example, when used for the purpose of treating/preventing, e.g., breast cancer in an adult, it is advantageous to administer the antibody of the present invention intravenously in a dose of about 0.01 to about 20 mg/kg body weight, preferably about 0.1 to about 10 mg/kg body weight and more preferably about 0.1 to about 5 mg/kg body weight, about 1 to 5 times/day, preferably about 1 to 3 times/day. In other parenteral and oral administration, the agent can be administered in a dose corresponding to the dose given above. When the condition is especially severe, the dose may be increased according to the condition.

The antibody of the present invention may be administered as it stands or in the form of an appropriate composition. The composition used for the administration may contain a pharmacologically acceptable carrier with the aforesaid antibody or its salts, a diluent or excipient. Such a composition is provided in the form of pharmaceutical preparations suitable for oral or parenteral administration (e.g., intravascular injection, subcutaneous injection, etc.). Each composition described above may further contain other active ingredients. Furthermore, the antibody of the present invention may be used in combination with other drugs, for example, alkylating agents (e.g., cyclophosphamide, ifosfamide, etc.), metabolic antagonists (e.g., methotrexate, 5-fluorouracil, etc.), anti-tumor antibiotics (e.g., mitomycin, adriamycin, etc.), plant-derived anti-tumor agents (e.g.,

vincristine, vindesine, Taxol, etc.), cisplatin, carboplatin, etoposide, irinotecan, etc. The antibody of the present invention and the drugs described above may be administered simultaneously or at staggered times to the patient.

The method of treatment described herein, particularly for cancers, may also be carried out with administration of other antibodies or chemotherapeutic agents. For example, an antibody against EGFR, such as ERBITUX® (cetuximab), may also be administered, particularly when treating colon cancer. ERBITUX® has also been shown to be effective for treatment of psoriasis. Other antibodies for combination use include Herceptin® (trastuzumab) particularly when treating breast cancer, AVASTIN® particularly when treating colon cancer and SGN-15 particularly when treating non-small cell lung cancer. The administration of the antibody of the present invention with other antibodies/chemotherapeutic agents may occur simultaneously, or separately, via the same or different route.

The chemotherapeutic agent/other antibody regimens utilized include any regimen believed to be optimally suitable for the treatment of the patient's condition. Different malignancies can require use of specific anti-tumor antibodies and specific chemotherapeutic agents, which will be determined on a patient to patient basis. In a preferred embodiment of the invention, chemotherapy is administered concurrently with or, more preferably, subsequent to antibody therapy. It should be emphasized, however, that the present invention is not limited to any particular method or route of administration.

The preponderance of evidence shows that AR47A6.4.2 mediates anti-cancer effects and prolongs survival through ligation of epitopes present on TROP-2. It has previously been shown (as disclosed in S.N. 11/709,676) that AR47A6.4.2 antibodies can be used to immunoprecipitate the cognate antigen from expressing cells such as MDA-MB-231 cells. Further it could be shown that AR47A6.4.2, chimeric AR47A6.4.2 ((ch)AR47A6.4.2) or humanized variants, (hu)AR47A6.4.2 can be used in the detection of cells and/or tissues which express a TROP-2 antigenic moiety which specifically binds thereto, utilizing techniques illustrated by, but not limited to FACS, cell ELISA or IHC.

As with the AR47A6.4.2 antibody, other anti-TROP-2 antibodies could be used to immunoprecipitate and isolate other forms of the TROP-2 antigen, and the antigen can

also be used to inhibit the binding of those antibodies to the cells or tissues that express the antigen using the same types of assays.

SEQ ID NOs

	SEQ ID NO:	Sequence
Heavy CDR1	1	NYGMN
Heavy CDR2	2	WINTKTGEPTYAEEFKG
Heavy CDR3	3	GGYGSSYWYFDV
Light CDR1	4	KASQDVSIAVA
Light CDR2	5	SASYRYT
Light CDR3	6	QQHYITPLT
HV2	7	Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R F V F S L E T S A S T A Y L Q I S S L K A E D T A M Y F C G R G G Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S
KV3	8	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I A V A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P D R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G G T K V E I K
KV4	9	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I A V A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P S R F S G S G S G T D F T F T I S S L Q P E D I A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G G T K V E I K
HV3	10	Q I Q L V Q S G H E V K K P G A S V K V S C K A S G Y T F T N Y G M N W V R Q A P G Q G L E W M G W I N T K T G E P T Y A E E F K G R F V F S L E T S A S T A Y L Q I S S L K A E D M A M Y F C G R G G Y G S S Y W Y F D V W G Q G T T V T V S S

All patents and publications mentioned in this specification are indicative of the levels of those skilled in the art to which the invention pertains. All patents and publications are herein incorporated by reference to the same extent as if each individual publication was specifically and individually indicated to be incorporated by reference.

It is to be understood that while a certain form of the invention is illustrated, it is not to be limited to the specific form or arrangement of parts herein described and shown. It will be apparent to those skilled in the art that various changes may be made without departing from the scope of the invention and the invention is not to be considered limited to what is shown and described in the specification. One skilled in the art will readily appreciate that the present invention is well adapted to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned, as well as those inherent therein. Any oligonucleotides, peptides, polypeptides, biologically related compounds, methods, procedures and techniques described herein are presently representative of the preferred embodiments, are intended to be exemplary and are not intended as limitations on the scope. Changes therein and other uses will occur to those skilled in the art which are encompassed within the spirit of the invention and are defined by the scope of the appended claims. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in the art are intended to be within the scope of the following claims.

WO 2008/144891 PCT/CA2008/000979
National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada
1015 Arlington Street
Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2
Tel: (204) 789-6030
Fax:(204) 789-2018

International Form IDAC/BP/4

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
(issued pursuant to Rule 7.1 of the *Budapest Treaty* Regulations)

ATTACH COPIES OF THE ORIGINAL DEPOSIT CONTRACT AND VIABILITY STATEMENT

This International Depository Authority accepts the deposit of the microorganism specified below, which was received by it on December 14, 2005

To (Name of Depositor): Valerie Harris

Address: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON, M5J 1R7

Identification of Deposit

Reference assigned by depositor: AR47A6.4.2

Accession Number assigned by this IDA: 141205-05

The deposit identified above was accompanied by:

☐ a scientific description (specify):

☐ a proposed taxonomic designation (specify):

Signature of person(s)authorized to represent IDAC:

Date: December 14, 2005

WO 2008/144891 PCT/CA2008/000979
National Microbiology Laboratory, Public Health Agency of Canada
1015 Arlington Street
Winnipeg, Manitoba Canada R3E 3R2
Tel: (204) 789-6030
Fax:(204) 789-2018

International Form IDAC/BP/9

STATEMENT OF VIABILITY
(Issued pursuant to Rule 10.2 of the *Budapest Treaty* Regulations)

Party to Whom the Viability Statement is Issued

Name: Ferris Lander

Address: 2855 PGA Boulevard, Palm Beach Gradens, Florida, USA 33410

Depositor

Name: Valerie Harris

Address: ARIUS Research Inc., 55 York Street, Suite 1600, Toronto, ON, M5J 1R7

Identification of the Deposit

Accession Number given by the International Depository Authority: 141205-05

Date of the original deposit (or most recent relevant date): December 14, 2005

Viability Test

The viability of the deposit identified above was tested on (most recent test date)

On the date indicated above, the culture was:

☑ viable

☐ no longer viable

Conditions under which the Viability Test were performed (to be filled in if the information has been requested and the results of the test were negative):

Signature of person(s) authorized to represent IDAC

Date: January 09, 2006

Statement of Viability 1/1

File number: 084 (05)

CLAIMS

What is claimed is:

Claim 1. A method of reduction of a human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor in a mammal, wherein said human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor expresses at least one epitope of an antigen which specifically binds to the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or a CDMAB thereof, which CDMAB is characterized by an ability to competitively inhibit binding of said isolated monoclonal antibody to its target antigen, comprising administering to said mammal said monoclonal antibody or CDMAB thereof in an amount effective to result in a reduction of said mammal's pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor burden.

Claim 2. The method of claim 1 wherein said isolated monoclonal antibody is conjugated to a cytotoxic moiety.

Claim 3. The method of claim 2 wherein said cytotoxic moiety is a radioactive isotope.

Claim 4. The method of claim 1 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof activates complement.

Claim 5. The method of claim 1 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof mediates antibody dependent cellular cytotoxicity.

Claim 6. The method of claim 1 wherein said isolated monoclonal antibody is a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said humanized antibody.

Claim 7. The method of claim 1 wherein said isolated monoclonal antibody is a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said chimeric antibody.

Claim 8. A method of reduction of a human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor susceptible to antibody induced cellular cytotoxicity in a mammal, wherein said human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor expresses at least one epitope of an antigen which specifically binds to the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or a CDMAB thereof, which CDMAB is characterized by an ability to competitively inhibit binding of said isolated monoclonal antibody to its target antigen, comprising administering to said mammal said monoclonal antibody or said CDMAB thereof in an amount effective to result in a reduction of said mammal's pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor burden.

Claim 9. The method of claim 8 wherein said isolated monoclonal antibody is conjugated to a cytotoxic moiety.

Claim 10. The method of claim 9 wherein said cytotoxic moiety is a radioactive isotope.

Claim 11. The method of claim 8 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof activates complement.

Claim 12. The method of claim 8 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof mediates antibody dependent cellular cytotoxicity.

Claim 13. The method of claim 8 wherein said isolated monoclonal antibody is a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said humanized antibody.

Claim 14. The method of claim 8 wherein said isolated monoclonal antibody is a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said chimeric antibody.

Claim 15. A method of reduction of a human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor in a mammal, wherein said human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor expresses at least one epitope of an antigen which specifically binds to the isolated

monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or a CDMAB thereof, which CDMAB is characterized by an ability to competitively inhibit binding of said isolated monoclonal antibody to its target antigen, comprising administering to said mammal said monoclonal antibody or CDMAB thereof in conjunction with at least one chemotherapuetic agent in an amount effective to result in a reduction of said mammal's pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor burden.

Claim 16. The method of claim 15 wherein said isolated monoclonal antibody is conjugated to a cytotoxic moiety.

Claim 17. The method of claim 16 wherein said cytotoxic moiety is a radioactive isotope.

Claim 18. The method of claim 15 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof activates complement.

Claim 19. The method of claim 15 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof mediates antibody dependent cellular cytotoxicity.

Claim 20. The method of claim 15 wherein said isolated monoclonal antibody is a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said humanized antibody.

Claim 21. The method of claim 15 wherein said isolated monoclonal antibody is a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said chimeric antibody.

Claim 22. Use of monoclonal antibodies for reduction of human breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor burden, wherein said human breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor expresses at least one epitope of an antigen which specifically binds to the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or a CDMAB thereof, which CDMAB is characterized by an ability to competitively inhibit binding of said isolated monoclonal antibody to its target

antigen, comprising administering to said mammal said monoclonal antibody or CDMAB thereof in an amount effective to result in a reduction of said mammal's human breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor burden.

Claim 23. The method of claim 22 wherein said isolated monoclonal antibody is conjugated to a cytotoxic moiety.

Claim 24. The method of claim 23 wherein said cytotoxic moiety is a radioactive isotope.

Claim 25. The method of claim 22 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof activates complement.

Claim 26. The method of claim 22 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof mediates antibody dependent cellular cytotoxicity.

Claim 27. The method of claim 22 wherein said isolated monoclonal antibody is a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05.

Claim 28. The method of claim 22 wherein said isolated monoclonal antibody is a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05.

Claim 29. Use of monoclonal antibodies for reduction of human breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor burden, wherein said human breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor expresses at least one epitope of an antigen which specifically binds to the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or a CDMAB thereof, which CDMAB is characterized by an ability to competitively inhibit binding of said isolated monoclonal antibody to its target antigen, comprising administering to said mammal said monoclonal antibody or CDMAB thereof; in conjunction with at least one chemotherapeutic agent in an amount effective to result in a reduction of said mammal's human breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor burden.

Claim 30. The method of claim 29 wherein said isolated monoclonal antibody is conjugated to a cytotoxic moiety.

Claim 31. The method of claim 30 wherein said cytotoxic moiety is a radioactive isotope.

Claim 32. The method of claim 29 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof activates complement.

Claim 33. The method of claim 29 wherein said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof mediates antibody dependent cellular cytotoxicity.

Claim 34. The method of claim 29 wherein said isolated monoclonal antibody is a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05.

Claim 35. The method of claim 29 wherein said isolated monoclonal antibody is a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05.

Claim 36. A process for reduction of a human breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor which expresses at least one epitope of human TROP-2 antigen which is specifically bound by the isolated monoclonal antibody produced by hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05, comprising:

administering to an individual suffering from said human tumor, at least one isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof that binds the same epitope or epitopes as those bound by the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05;

wherein binding of said epitope or epitopes results in a reduction of breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor burden.

Claim 37. A process for reduction of a human breast, pancreatic, ovarian, prostate or colon tumor which expresses at least one epitope of human TROP-2 antigen which is specifically bound by the isolated monoclonal antibody produced by hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05, comprising:

administering to an individual suffering from said human tumor, at least one isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof, that binds the same epitope or epitopes as those bound by the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05; in conjunction with at least one chemotherapeutic agent;

wherein said administration results in a reduction of tumor burden.

Claim 38. A binding assay to determine a presence of cancerous cells in a tissue sample selected from a human tumor, which is specifically bound by the isolated monoclonal antibody produced by hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05, the humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or the chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, comprising:

providing a tissue sample from said human tumor;

providing at least one of said isolated monoclonal antibody, said humanized antibody, said chimeric antibody or CDMAB thereof that recognizes the same epitope or epitopes as those recognized by the isolated monoclonal antibody produced by a hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05;

contacting at least one said provided antibodies or CDMAB thereof with said tissue sample; and determining binding of said at least one provided antibody or CDMAB thereof with said tissue sample;

whereby the presence of said cancerous cells in said tissue sample is indicated.

Claim 39. A binding assay to determine the presence of cells which express TROP-2 which is specifically recognized by the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05, the humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or the chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05, comprising:

providing a cell sample;

providing the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05, said humanized antibody, said chimeric antibody or CDMAB thereof;

contacting said isolated monoclonal antibody or said antigen binding fragment with said cell sample; and

determining binding of said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof with said cell sample;

whereby the presence of cells which express an antigen of TROP-2 which is specifically bound by said isolated monoclonal antibody or said CDMBA thereof is determined.

Claim 40. A method for inducing complement dependent cytotoxicity of cancerous cells, which express at least one epitope of TROP-2 on the cell's surface, which at least one epitope, when bound by the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said isolated monoclonal antibody results in cell cytotoxicity, comprising:

providing the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said isolated monoclonal antibody, and

contacting said cancerous cells with said isolated monoclonal antibody or said antigen binding fragment;

whereby cytotoxicity occurs as a result of binding of said isolated monoclonal antibody or said antigen binding fragment with said at least one epitope of TROP-2.

Claim 41. The method of claim 40 wherein said isolated monoclonal antibody is conjugated to a cytotoxic moiety.

Claim 42. The method of claim 41 wherein said cytotoxic moiety is a radioactive isotope.

Claim 43. The method of claim 40 wherein said isolated monoclonal antibody activates complement.

Claim 44. The method of claim 40 wherein said isolated monoclonal antibody mediates cellular cytotoxicity.

Claim 45. The method of claim 40 wherein said monoclonal antibody is a humanized antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said humanized antibody.

Claim 46. The method of claim 40 wherein said monoclonal antibody is a chimeric antibody of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said chimeric antibody.

Claim 47. A method for inducing complement dependent cytotoxicity of cancerous cells, which express at least one epitope of TROP-2 on the cell's surface, which at least one epitope, when bound by the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as 141205-05 or an antigen binding fragment produced from said isolated monoclonal antibody results in cell cytotoxicity, comprising:

providing an isolated monoclonal antibody which competitively inhibits binding of the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as 141205-05 or of an antigen binding fragment produced from said isolated monoclonal antibody, and which when bound by said at least one epitope of TROP-2, results in cell cytotoxicity; and

contacting said cancerous cells with said isolated monoclonal antibody or said antigen binding fragment;

whereby cytotoxicity occurs as a result of binding of said isolated monoclonal antibody or said antigen binding fragment with said at least one epitope of TROP-2.

Claim 48. A monoclonal antibody which specifically binds to the same epitope or epitopes as the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05.

Claim 49. An isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof, which specifically binds to human TROP-2, in which the isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof reacts with the same epitope or epitopes of human TROP-2 as the isolated monoclonal antibody produced

by a hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05; said isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof being characterized by an ability to competitively inhibit binding of said isolated monoclonal antibody to its target human TROP-2 antigen.

Claim 50. An isolated monoclonal antibody or CDMAB thereof that recognizes the same epitope or epitopes as those recognized by the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05; said monoclonal antibody or CDMAB thereof being characterized by an ability to competitively inhibit binding of said isolated monoclonal antibody to its target epitope or epitopes.

Claim 51. A humanized antibody that specifically binds the same epitope or epitopes of human TROP-2 as the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05, comprising:

a heavy chain variable region comprising the complementarity determining region amino acid sequences of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, and SEQ ID NO:3; and a light chain variable region comprising the complementarity determining region amino acid sequences of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:6;

or a human TROP-2 binding fragment thereof.

Claim 52. A humanized antibody that specifically binds the same epitope or epitopes of human TROP-2 as the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma cell line AR47A6.4.2 having IDAC Accession No. 141205-05, comprising:

a heavy chain variable region comprising the complementarity determining region amino acid sequences of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, and SEQ ID NO:3; and a light chain variable region comprising the complementarity determining region amino acid sequences of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, or SEQ ID NO:6; and variable domain framework regions from the heavy and light chains of a human antibody or human antibody consensus framework;

or a human TROP-2 binding fragment thereof.

Claim 53. A humanized antibody that specifically binds human TROP-2, wherein said monoclonal antibody comprises a heavy chain variable region amino acid sequence of SEQ ID NO:7; and a light chain variable region amino acid sequence selected of SEQ ID NO:8;

or a human TROP-2 binding fragment thereof.

Claim 54. A humanized antibody that specifically binds human TROP-2, wherein said monoclonal antibody comprises a heavy chain variable region amino acid sequence of SEQ ID NO:7; and a light chain variable region amino acid sequence selected of SEQ ID NO:9;

or a human TROP-2 binding fragment thereof.

Claim 55. A humanized antibody that specifically binds human TROP-2, wherein said monoclonal antibody comprises a heavy chain variable region amino acid sequence of SEQ ID NO:10; and a light chain variable region amino acid sequence selected of SEQ ID NO:8;

or a human TROP-2 binding fragment thereof.

Claim 56. A humanized antibody that specifically binds human TROP-2, wherein said monoclonal antibody comprises a heavy chain variable region amino acid sequence of SEQ ID NO:10; and a light chain variable region amino acid sequence selected of SEQ ID NO:9;

or a human TROP-2 binding fragment thereof.

Claim 57. A composition effective for treating a human pancreatic, prostate, ovarian, breast or colon tumor comprising in combination:

an antibody or CDMAB of any one of claims 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, 49, 50, 54, 55, or 56;

a conjugate of said antibody or an antigen binding fragment thereof with a member selected from the group consisting of cytotoxic moieties, enzymes, radioactive compounds, cytokines, interferons, target or reporter moieties and hematogenous cells; and

a requisite amount of a pharmacologically acceptable carrier;

wherein said composition is effective for treating said human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor.

Claim 58. A composition effective for treating a human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor comprising in combination:

an antibody or CDMAB of any one of claims 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, 49, 50, 54, 55, or 56; and a requisite amount of a pharmacologically acceptable carrier;

wherein said composition is effective for treating said human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor.

Claim 59. A composition effective for treating a human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor comprising in combination:

a conjugate of an antibody, antigen binding fragment, or CDMAB of any one of claims 1, 2, 3, 6, 7, 8, 17, 49, 50, 54, 55, or 56; with a member selected from the group consisting of cytotoxic moieties, enzymes, radioactive compounds, cytokines, interferons, target or reporter moieties and hematogenous cells; and

a requisite amount of a pharmacologically acceptable carrier;

wherein said composition is effective for treating said human pancreatic, breast, prostate, ovarian or colon tumor.

Claim 60. An assay kit for detecting the presence of a human cancerous tumor, wherein said human cancerous tumor expresses at least one epitope of an antigen which specifically binds to the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or a CDMAB thereof, which CDMAB is characterized by an ability to competitively inhibit binding of said isolated monoclonal antibody to its target antigen, the kit comprising the isolated monoclonal antibody produced by the hybridoma deposited with the IDAC as accession number 141205-05 or a CDMAB thereof, and means for detecting whether the monoclonal antibody, or a CDMAB thereof, is bound to a polypeptide whose presence, at a particular cut-off level, is diagnostic of said presence of said human cancerous tumor.

FIGURE 1

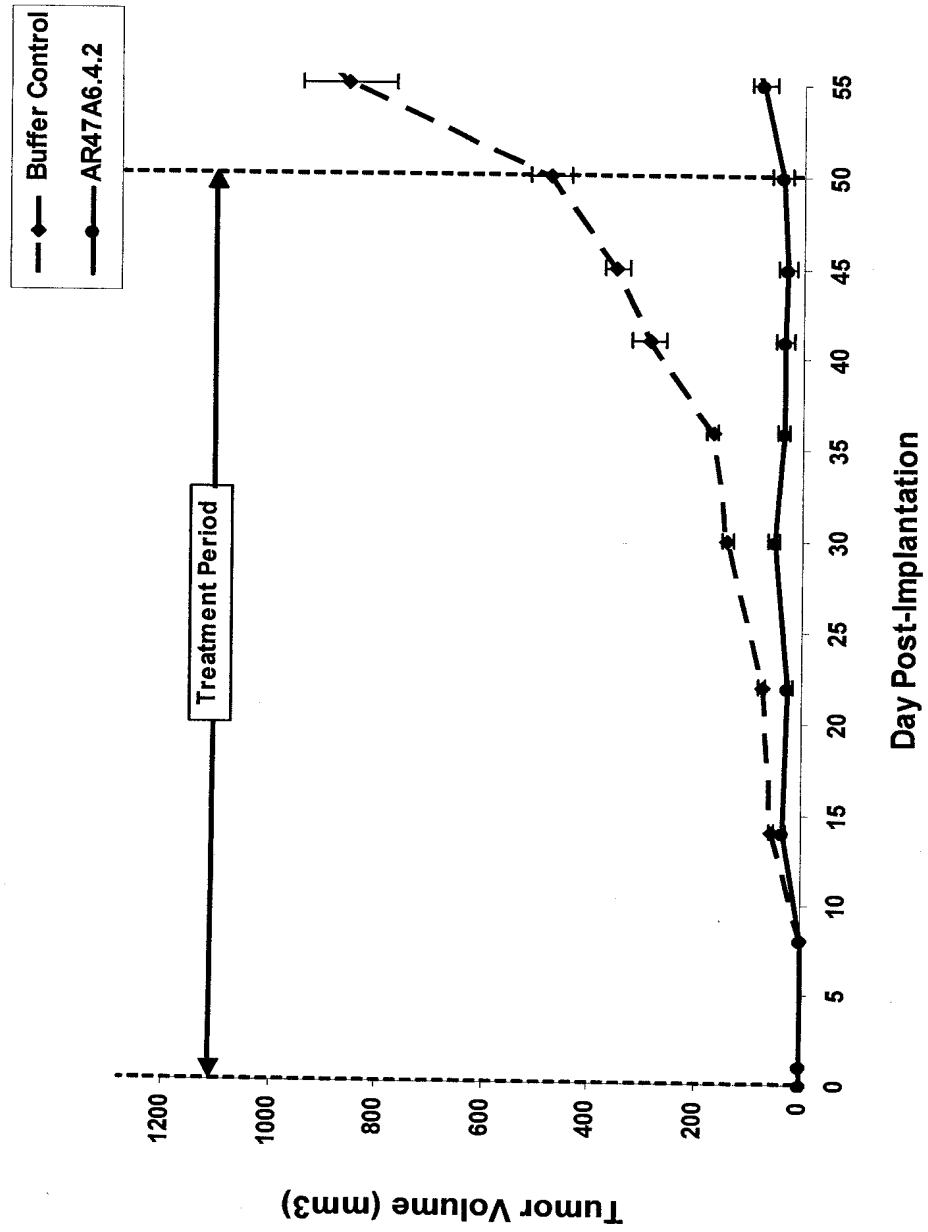
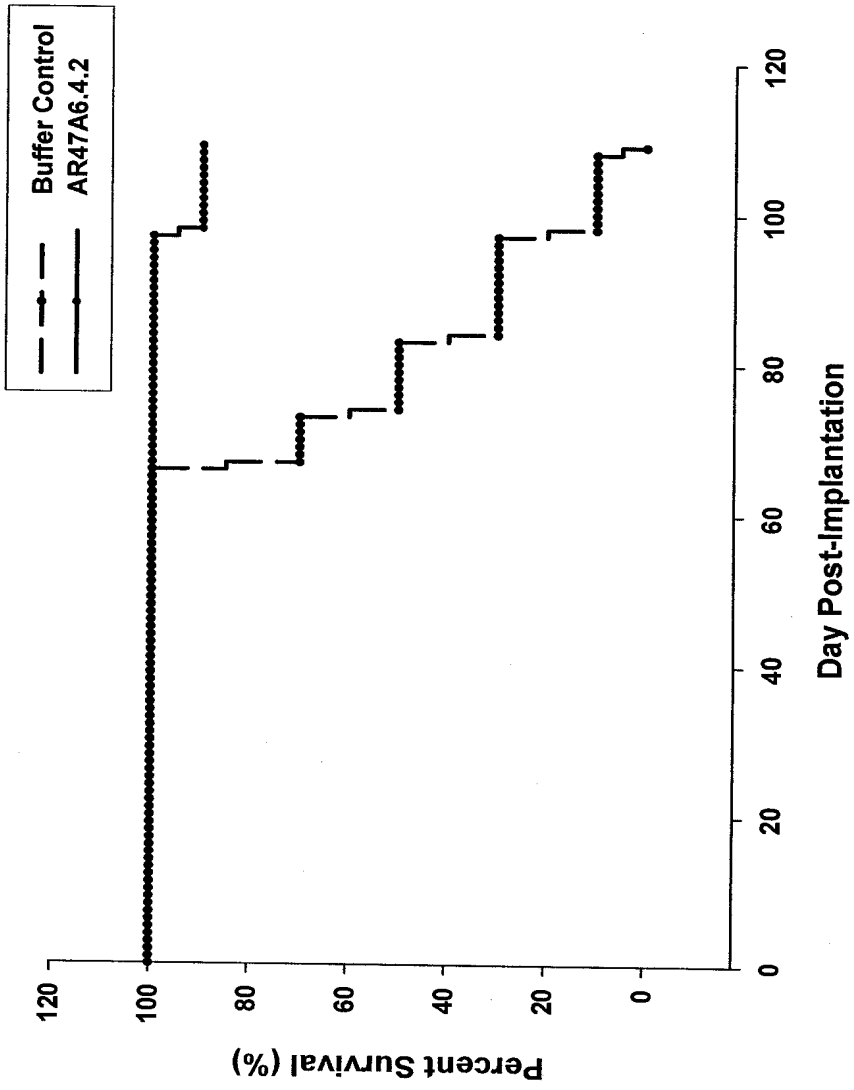

Buffer Control
AR47A6.4.2
Treatment Period
Tumor Volume (mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
Day Post-Implantation

FIGURE 2


Buffer Control
AR47A6.4.2
Percent Survival (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
120
Day Post-Implantation

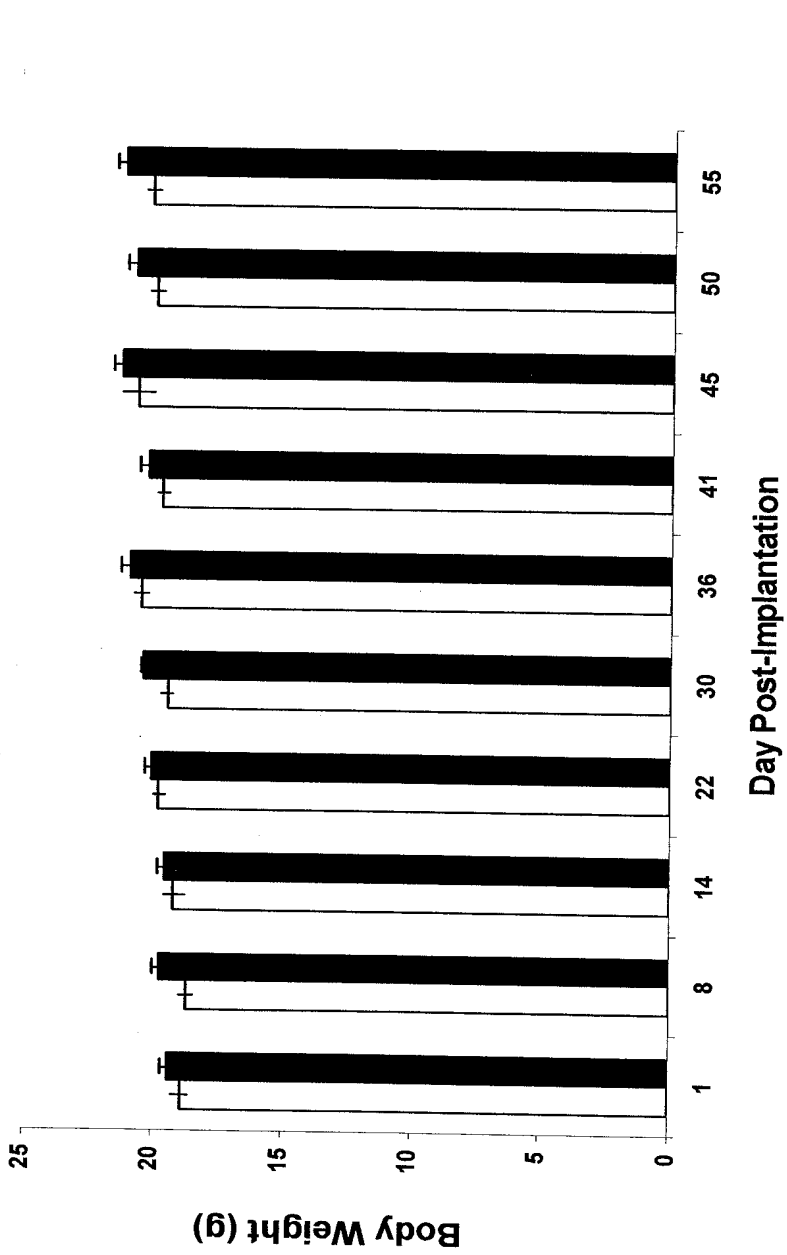

Buffer Control
AR47A6.4.2
Body Weight (g)
0
5
10
15
20
25
Day Post-Implantation
1
8
14
22
30
36
41
45
50
55

FIGURE 3

FIGURE 4

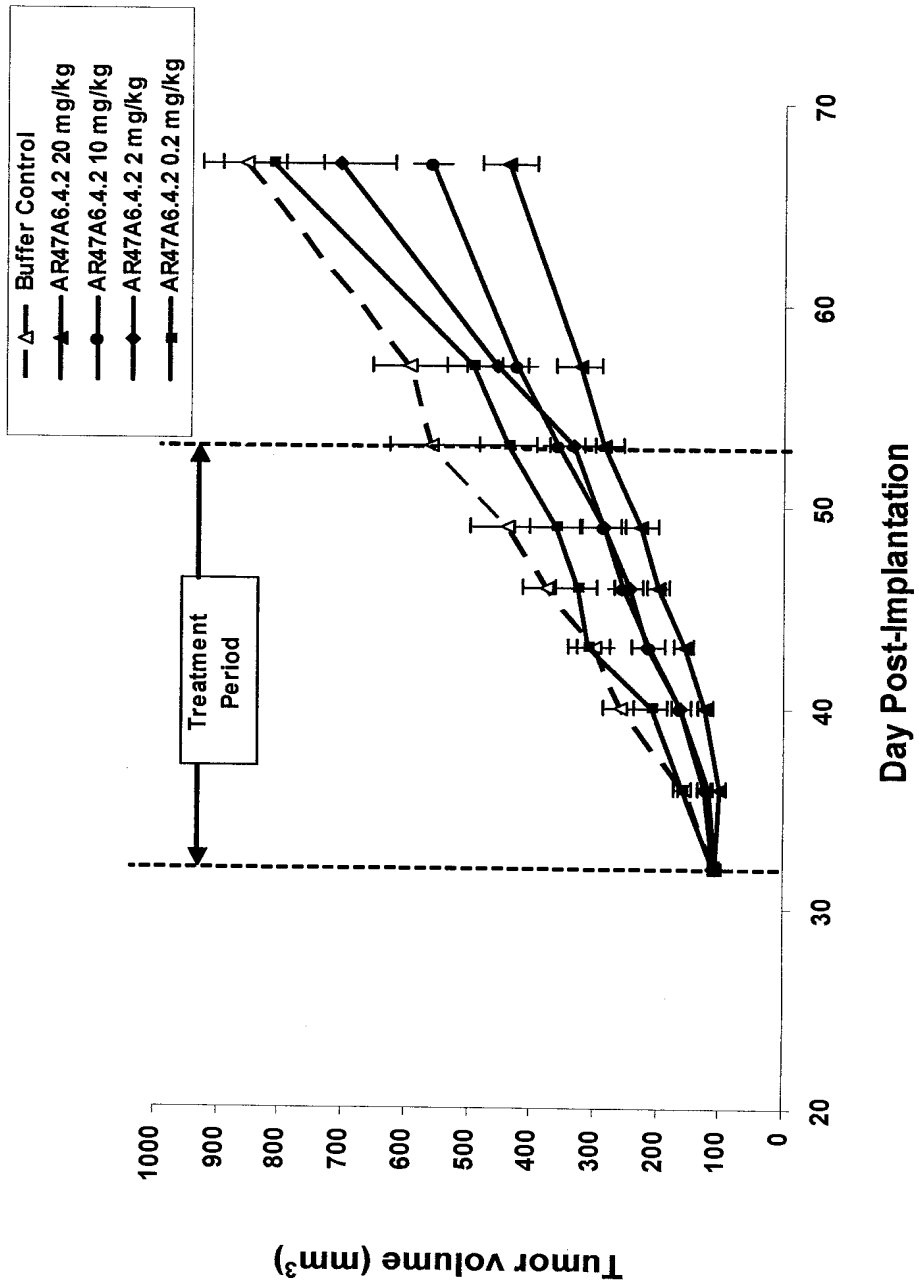

Buffer Control
AR47A6.4.2 20 mg/kg
AR47A6.4.2 10 mg/kg
AR47A6.4.2 2 mg/kg
AR47A6.4.2 0.2 mg/kg
Treatment Period
Tumor volume (mm3)
Day Post-Implantation
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
20
30
40
50
60
70

FIGURE 5

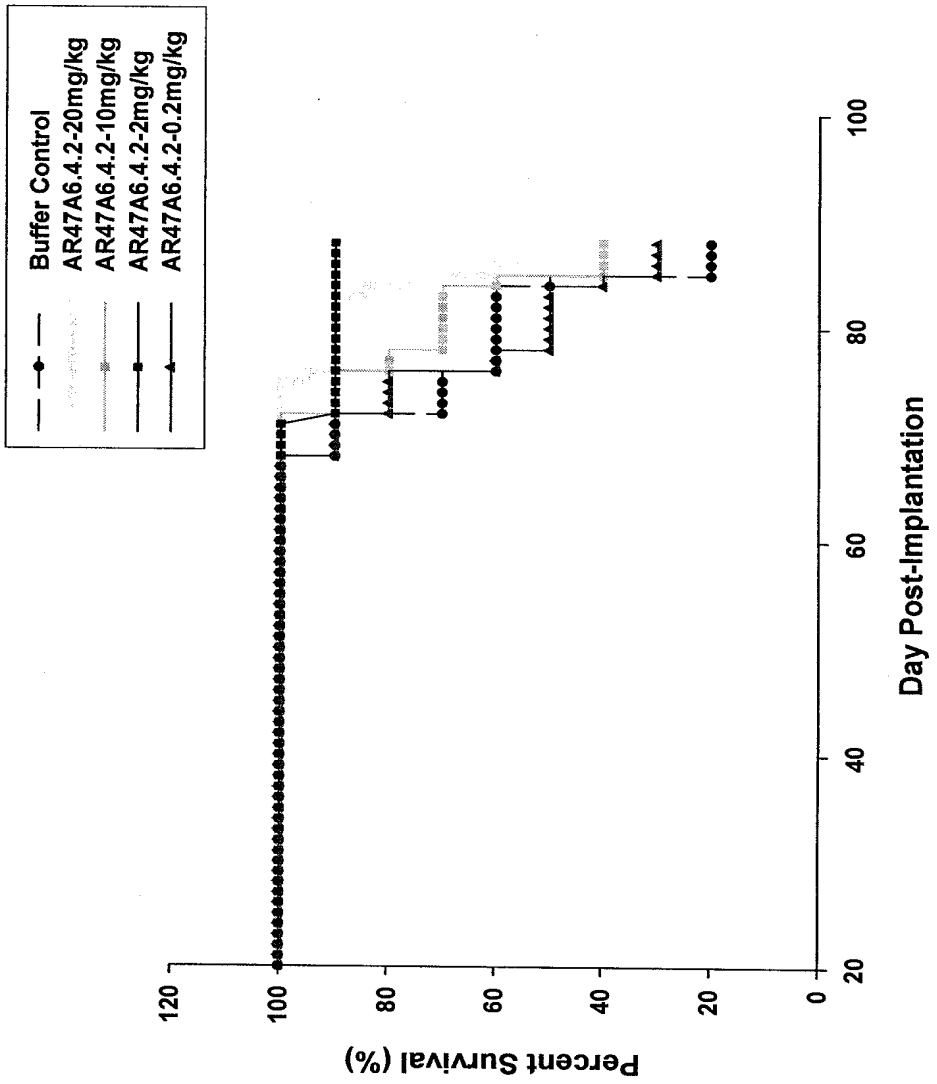

Buffer Control
AR47A6.4.2-20mg/kg
AR47A6.4.2-10mg/kg
AR47A6.4.2-2mg/kg
AR47A6.4.2-0.2mg/kg
Percent Survival (%)
120
100
80
60
40
20
0
20
40
60
80
100
Day Post-Implantation

FIGURE 6

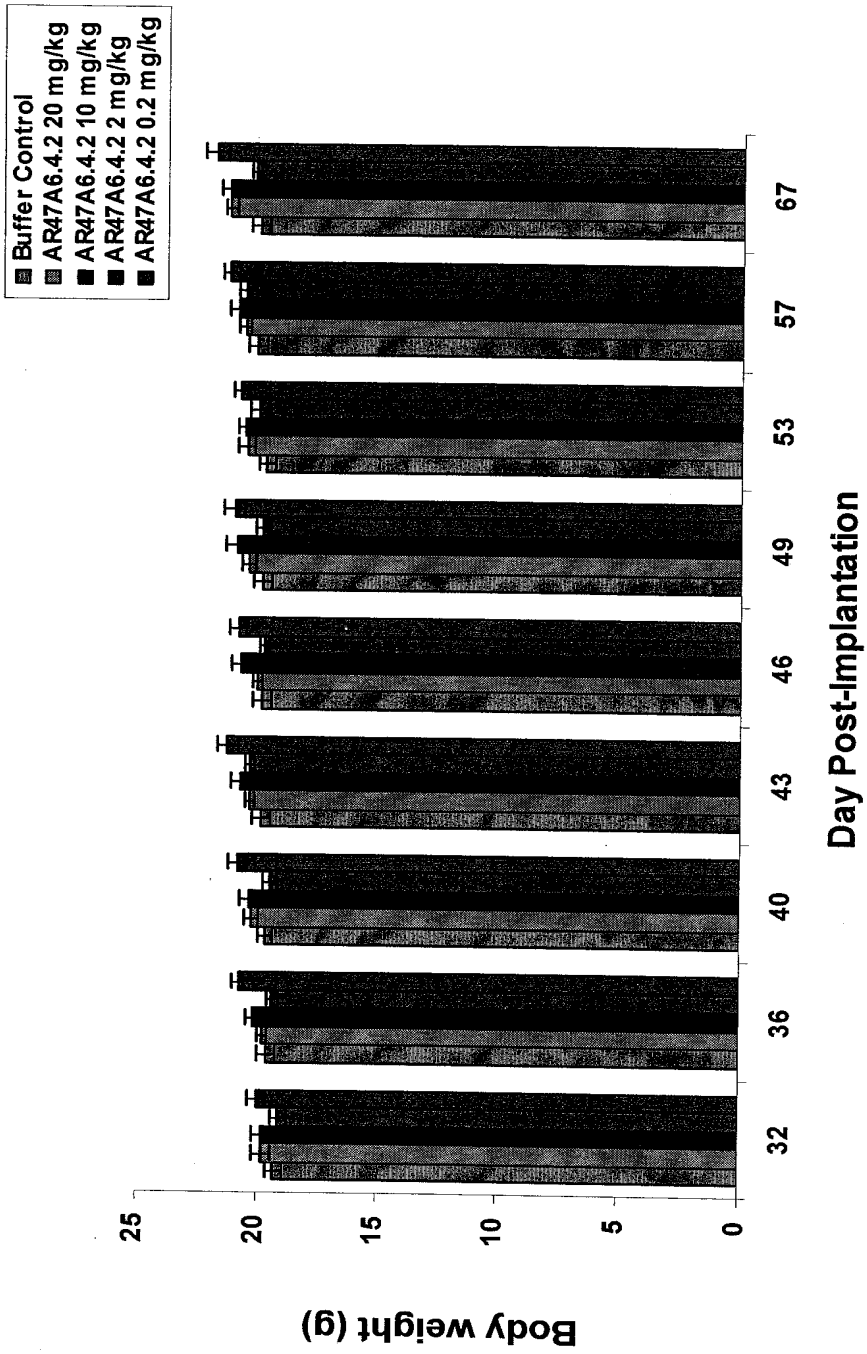

Buffer Control
AR47A6.4.2 20 mg/kg
AR47A6.4.2 10 mg/kg
AR47A6.4.2 2 mg/kg
AR47A6.4.2 0.2 mg/kg
Body weight (g)
0
5
10
15
20
25
Day Post-Implantation
32
36
40
43
46
49
53
57
67

FIGURE 7

Tissue	Total	IHC Score			
		-	Moderate-Strong (++,+++) Positive	Weak (+/-,+) Positive	Total Positive
Colon Cancer	11	3	6/11 (55%)	2/11 (18%)	8/11 (73%)
Normal Colon	2	2	0	0	0
Ovarian Cancer	8	2	6/8 (75%)	0	6/8 (75%)
Normal Ovary	2	2	0	0	0
Breast Cancer	12	0	11/12 (92%)	1/12 (8%)	12/12 (100%)
Normal Breast	4	0	4/4 (100%)	0	4/4 (100%)
Lung Cancer	15	0	12/15 (80%)	3/15 (20%)	15/15 (100%)
Normal Lung	4	0	3/4 (75%)	1/4 (25%)	4/4 (100%)
Prostate Cancer	14	0	14/14 (100%)	0	14/14 (100%)
Normal Prostate	4	0	3/4 (75%)	1/4 (25%)	4/4 (100%)
Pancreatic Cancer	14	9	3/14 (21%)	2/14 (14%)	5/14 (36%)
Normal Pancreas	5	0	5/5 (100%)	0	5/5 (100%)

FIGURE 8

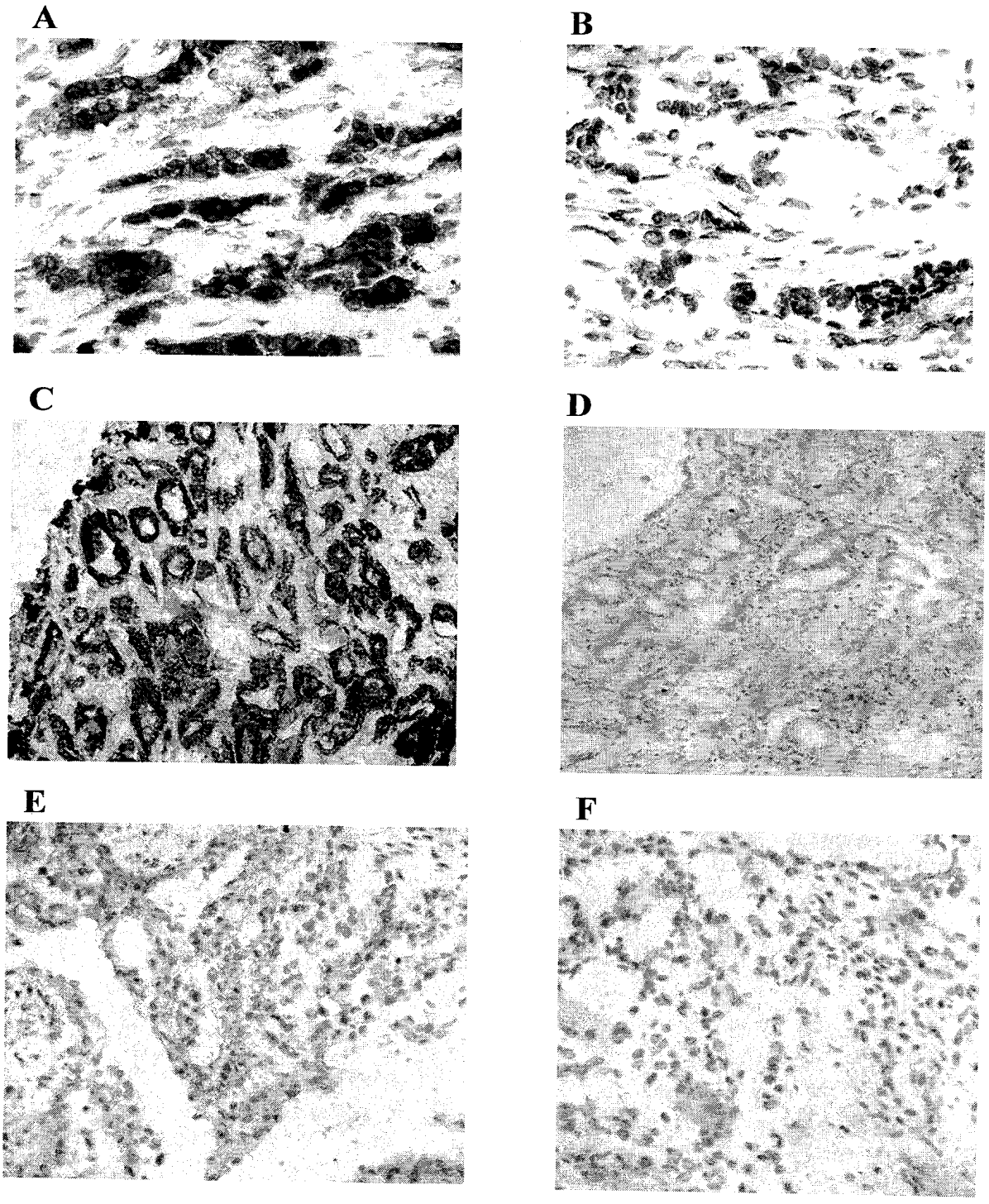


FIGURE 9

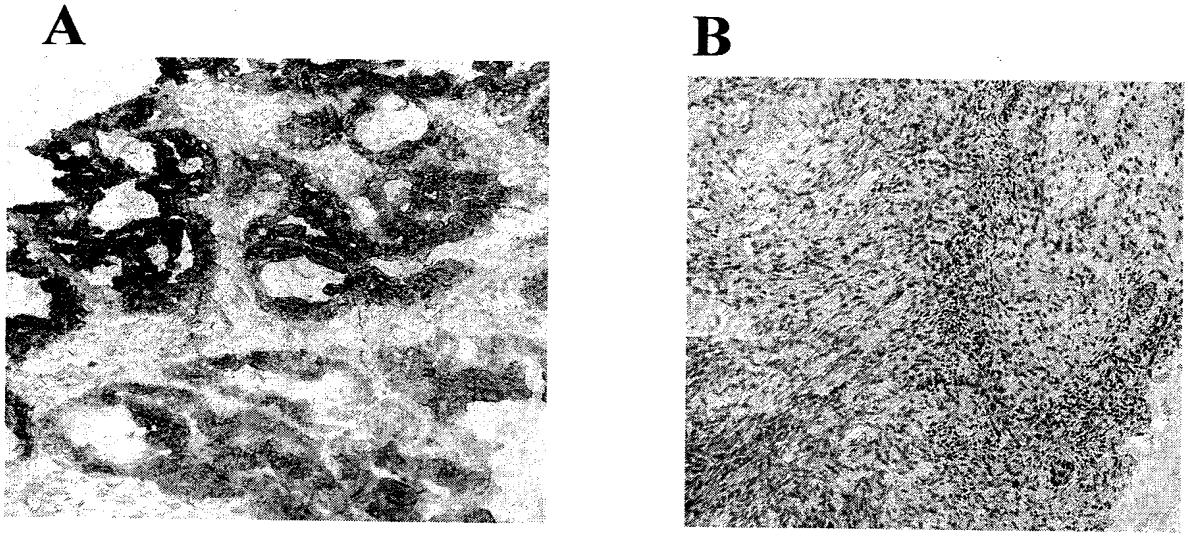


FIGURE 10

Phosphorylated Protein (Target)	Percent Suppression With AR47A6.4.2
ERK1 (p44MAPK)	32
ERK2 (p42MAPK)	20
Akt1 (PKBalpha)	15
Akt2 (PKBbeta)	18
Akt3 (PKBgamma)	27

FIGURE 11

Secreted Factor	Percent Suppression
VEGF	21
PLGF	77

FIGURE 12

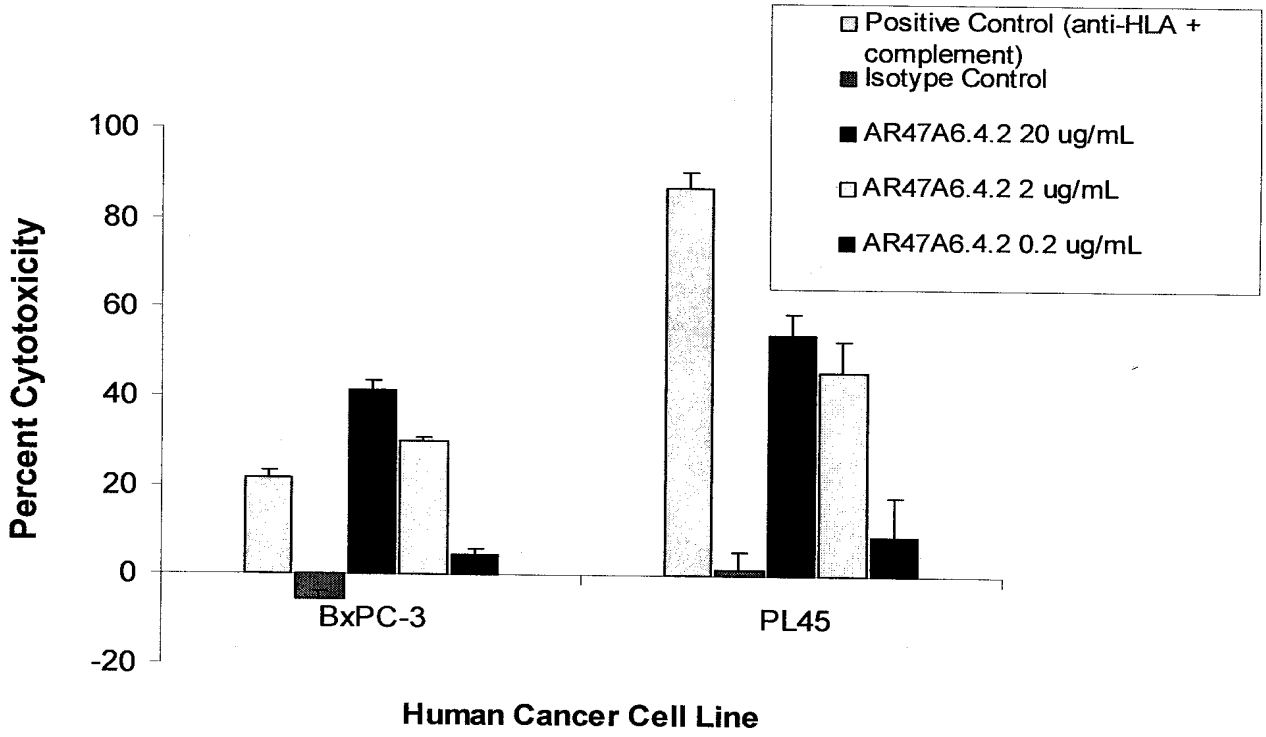

Positive Control (anti-HLA + complement)
Isotype Control
AR47A6.4.2 20 ug/mL
AR47A6.4.2 2 ug/mL
AR47A6.4.2 0.2 ug/mL
Percent Cytotoxicity
100
80
60
40
20
0
-20
BxPC-3
PL45
Human Cancer Cell Line

FIGURE 13

Number	Peptide	Binding of AR47A6.4.2
1	RRLFRERYRLHPKF	518
2	RLFRERYRLHPKFV	387
3	GMAVLVITNRRKSG	349
4	MAVLVITNRRKSGK	335
5	LVAGMAVLVITNRR	317
6	AVLVITNRRKSGKY	308
7	AELRRLFRERYRLH	306
8	LFRERYRLHPKFVA	303
9	LFQGRGGLDLRVRG	302
10	VAGMAVLVITNRRK	296
11	LQVERTLIYYLDEI	293
12	ELRRLFRERYRLHP	291
13	LVRTHHILIDLRHR	291
14	AGMAVLVITNRRKS	285
15	LVITNRRKSGKYKK	283
16	DAELRRLFRERYRL	280
17	LRRLFRERYRLHPK	277
18	LDAELRRLFRERYR	276
19	VLVITNRRKSGKYK	273
20	PLQVERTLIYYLDE	262

FIGURE 14

```
  1 MARGPGLAPP PLRLPLLLLV LAAVTGHTAA QDNCTCPTNK MTVCSPDGPG
 51 GRCQCRALGS GMAVDCSTLT SKCLLLKARM SAPKNARTLV RPSEHALVDN
101 DGLYDPDCDP EGRFKARQCN QTSVCWCVNS VGVRRTDKGD LSLRCDDLVR
151 THHILIDLRH RPTAGAFNHS DLDAELRRLF RERYRLHPKF VAAVHYEQPT
201 IQIELRQNTS QKAAGEVDIG DAAYYFERDI KGESLFQGRG GLDLRVRGEP
251 LQVERTLIYY LDEIPPKFSM KRLTAGLIAV IVVVVVALVA GMAVLVITNR
310 RKSGKYKKVE IKELGELRKE PSL
```

FIGURE 15

Primer Code	Sequence	Length	Name-Pool
OL024	ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT	24	MuIgkV$_L$5'-LA
OL025	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT	25	MuIgkV$_L$5'-LB
OL026	ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT	29	MuIgkV$_L$5'-LC
OL027	ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT	32	MuIgkV$_L$5'-LD
OL028	ATGGGCWTCAAGATGRAGTCACAKWYYCWGG	31	MuIgkV$_L$5'-LD
OL029	ATGAGTGTGCYCACTCAGGTCCTGGSGTT	29	MuIgkV$_L$5'-LE
OL030	ATGTGGGGAYCGKTTTYAMMCTTTTCAATTG	31	MuIgkV$_L$5'-LE
OL031	ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC	28	MuIgkV$_L$5'-LE
OL032	ATGAGIMMKTCIMTTCAITTCYTGGG	26	MuIgkV$_L$5'-LF
OL033	ATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG	26	MuIgkV$_L$5'-LF
OL034	ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG	25	MuIgkV$_L$5'-LF
OL035	ATGTATATATGTTTGTTGTCTATTTCT	27	MuIgkV$_L$5'-LF
OL036	ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	29	MuIgkV$_L$5'-LG
OL037	ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT	29	MuIgkV$_L$5'-LG
OL038	ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG	27	MuIgkV$_L$5'-LG
OL039	ATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG	27	MuIgkV$_L$5'-LG
OL040	ACTGGATGGTGGGAAGATGGA	21	MuIgkV$_L$3'-1
OL04I	ATGGCCTGGAYTYCWCTYWTMYTCT	25	MuIgλV$_L$5'-LI
OL042	AGCTCYTCWGWGGAIGGYGGRAA	23	MuIgλV$_L$3'-1

FIGURE 16

Primer Code	Sequence	Length	Name-Pool
OL007	ATGRASTTSKGGYTMARCTKGRTTT	25	MuIgV$_H$5'-HA
OL008	ATGRAATGSASCTGGGTYWTYCTCTT	26	MuIgV$_H$5'-HB
OL009	ATGGACTCCAGGCTCAATTTAGTTTTCCT	29	MuIgV$_H$5'-HC
OL010	ATGGCTGTCYTRGBGCTGYTCYTCTG	26	MuIgV$_H$5'-HC
OL011	ATGGVTTGGSTGTGGAMCTTGCYATTCCT	29	MuIgV$_H$5'-HC
OL012	ATGAAATGCAGCTGGRTYATSTTCTT	26	MuIgV$_H$5'-HD
OL013	ATGGRCAGRCTTACWTYYTCATTCCT	26	MuIgV$_H$5'H-D
OL014	ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT	26	MuIgV$_H$5'-HD
OL015	ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT	26	MuIgV$_H$5'-HE
OL0I6	ATGAAGWTGTGGBTRAACTGGRT	23	MuIgV$_H$5'-HE
OL017	ATGGRATGGASCKKIRTCTTTMTCT	25	MuIgV$_H$5'-HE
OL018	ATGAACTTYGGGYTSAGMTTGRTTT	25	MuIgV$_H$5'-HF
OL019	ATGTACTTGGGACTGAGCTGTGTAT	25	MuIgV$_H$5'-HF
OL020	ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG	23	MuIgV$_H$5'-HF
OL021	ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG	28	MuIgV$_H$5'-HF
OL023	CCAGGGRCCARKGGATARACIGRTGG	26	MuIgGV$_H$3'-2

FIGURE 17

CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAAGATCTCCTGCAAGGCTTCTGGGTATACCTTCACA
GTCTAGGTCAACCACGTCAGACCTGGACTCGACTTCTTCGGACCTCTCTGTCAGTTCTAGAGGACGTTCCGAACCCATATGGAAGTGT
Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S C K A S G Y T F T
AACTATGGAATGAACTGGGTGAAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGATGGGCTGGATAAACACCAAAACTGGAGAGCCAACATAT
TTGATACCTTACTTGACCCACTTCGTCCGAGGTCCTTTCCCAAATTTCACCTACCCGACCTATTTGTGGTTTTGACCTCTCGGTTGTATA
N Y G M N W V K Q A P G K G L K W M G W I N T K T G E P T Y
GCTGAAGAGTTCAAGGGACGGTTTGCCTTCTCTTTGGAAACCTCTGCCAGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCTCAAAAAAGAGGAC
CGACTTCTCAAGTTCCCTGCCAAACGGAAGAGAAACCTTTGGAGACGGTCGTGACGGATAAACGTCTAGTTGTTGGAGTTTTTCTCCTG
A E E F K G R F A F S L E T S A S T A Y L Q I N N L K K E D
ACGGCTACATATTTCTGTGGAAGAGGGGGCTACGGTAGTAGCTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TGCCGATGTATAAAGACACCTTCTCCCCCGATGCCATCATCGATGACCATGAAGCTACAGACCCCGCGTCCCTGGTGCCAGTGGCAGAGG
T A T Y F C G R G G Y G S S Y W Y F D V W G A G T T V T V S
TCA 363
AGT
S

FIGURE 18

```
GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGCATCTGTGGGAGAAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTAC 90
CTGTAGGTCTACTGAGTCAGAGGTCGGAGGGATAGACGTAGACACCCTCTTTGACAGTGGTAGTGTACAGCTCGTTCACTCTTATAAATG

 D  I  Q  M  T  Q  S  P  A  S  L  S  A  S  V  G  E  T  V  T  I  T  C  R  A  S  E  N  I  Y

AGTTATTTAGCATGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAATGCAAAAACCTTAGCAGAAGGTGTGCCATCA 18
TCAATAAATCGTACCATAGTCGTCTTTGTCCCTTTTAGAGGAGTCGAGGACCAGATATTACGTTTTTGGAATCGTCTTCCACACGGTAGT

 S  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K  Q  G  K  S  P  Q  L  L  V  Y  N  A  K  T  L  A  E  G  V  P  S

AGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGCACACAGTTTTCTCTGAAGATCAACAGCCTGCGGCCTGAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACAT 27
TCCAAGTCACCGTCACCCAGTCCGTGTGTCAAAAGAGACTTCTAGTTGTCGGACGCCGGACTTCTAAAACCCTCAATAATGACAGTTGTA

 R  F  S  G  S  G  S  G  T  Q  F  S  L  K  I  N  S  L  R  P  E  D  F  G  S  Y  Y  C  Q  H

CATTATGGTTCTCCGCTCACGTTCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAGA 321
GTAATACCAAGAGGCGAGTGCAAGCCACGACCCTGGTTCGACCTCGACTCT

 H  Y  G  S  P  L  T  F  G  A  G  T  K  L  E  L  R
```

FIGURE 19

Oligonucleotide Code		Sequence	Length
OL	334	GATCACGCGTGTCCACTCCCAGATCCAGTTGGTGCAGTC	39
OL	335	GTACAAGCTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGG	33
OL	368	GATCACGCGTGTCCACTCCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAA	54
OL	369	CAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGAGCGTCAGTCAAGGTCTCCTGCAA	53
OL	370	TAAACCCTGTCCTGGAGCCTGCGGCACCCAGTTC	34
OL	371	CAGGCTCCAGGACAGGGTTTAGAGTGGATGGGC	33
OL	372	TGCTGATCTGCAAATAGGCAGTGCTGGCAGAGGTTTCCAAAGAAGACAAACCGTCC	58
OL	373	CTGCCTATTTGCAGATCAGCAGCCTCAAAGCAGAGGACACGGCTATGTATTTCTGTG	57
OL	374	CTAGAAGCTTACCTGAGGAGACGGTGACCGTGGTCCCTTGGCCCCAGACA	50
OL	375	GATCACGCGTGTCCACTCCCAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACATGAGGTGAAGAAGCC	60
OL	376	AATACATAGCCATGTCCTCTGC	22
OL	377	GCAGAGGACATGGCTATGTATT	22
OL	378	AGAGGACATGGCTATGTATTACTGTGGAAGA	31
OL	379	CTGGCAGAGGTGTCCAAAGAGA	22
OL	380	TCTCTTTGGACACCTCTGCCAG	22
OL	381	GATCACGCGTGTCCACTCCCAGGTCCAGTTGGTG	34
OL	382	GAGGTGTCCATAGAGAAGACA	21
OL	383	TGTCTTCTCTATGGACACCTC	21
OL	384	AGCCCCCTCTTGCACAGTAATA	22
OL	385	TATTACTGTGCAAGAGGGGGCT	22

FIGURE 20

Oligonucleotide Code	Sequence	Length
OL 336	CATGGCGCGCGATGTGACATTGTGATGACCCAGTC	35
OL 337	TGCGGGATCCAACTGAGGAAGCAAAGTTTAAATTCTACTCACGTTTCAGCTCCAGCTTGGTCC	63
OL 386	GATCGCGCGCGATGTGACATTGTGATGACCCAGTCTCCCTCATTCCTGTCCGCATCAGTAGG	62
OL 387	ATTCCTGTCCGCATCAGTAGGAGACAGGGTCACCATCACCTGC	43
OL 388	ACTTTAGGAGCTTTTCCTGGTTTC	24
OL 389	GAAACCAGGAAAAGCTCCTAAAGT	24
OL 390	GTCTTCAGCCTGCAGAGAACTGATGGTG	28
OL 391	GTTCTCTGCAGGCTGAAGACATCGCAGTTTATT	33
OL 392	GATCGGATCCAACTGAGGAAGCAAAGTTTAAATTCTACTCACGTTTAATCTCCACCTTGGTCCCACCACCGAACG	75
OL 393	GATCGCGCGCGATGTGACATTGTGATGACCCAGTCTCCCTCATCCCTGTCCGCA	54
OL 394	CGATGTCTTCAGGCTGCAGAGAAC	24
OL 395	GTTCTCTGCAGCCTGAAGACATCG	24
OL 396	GATCGCGCGCGATGTGACATTCAGATGACCCAGT	34
OL 397	TCCACTGCCACTGAAGCGATC	21
OL 398	GATCGCTTCAGTGGCAGTGGA	21
OL 399	CACTGAAGCGACTAGGGACTCCA	23
OL 400	TGGAGTCCCTAGTCGCTTCAGTG	23
OL 401	TCTGCAGCCTGAAGACATCGCAACTTATTACTGTC	35

FIGURE 21

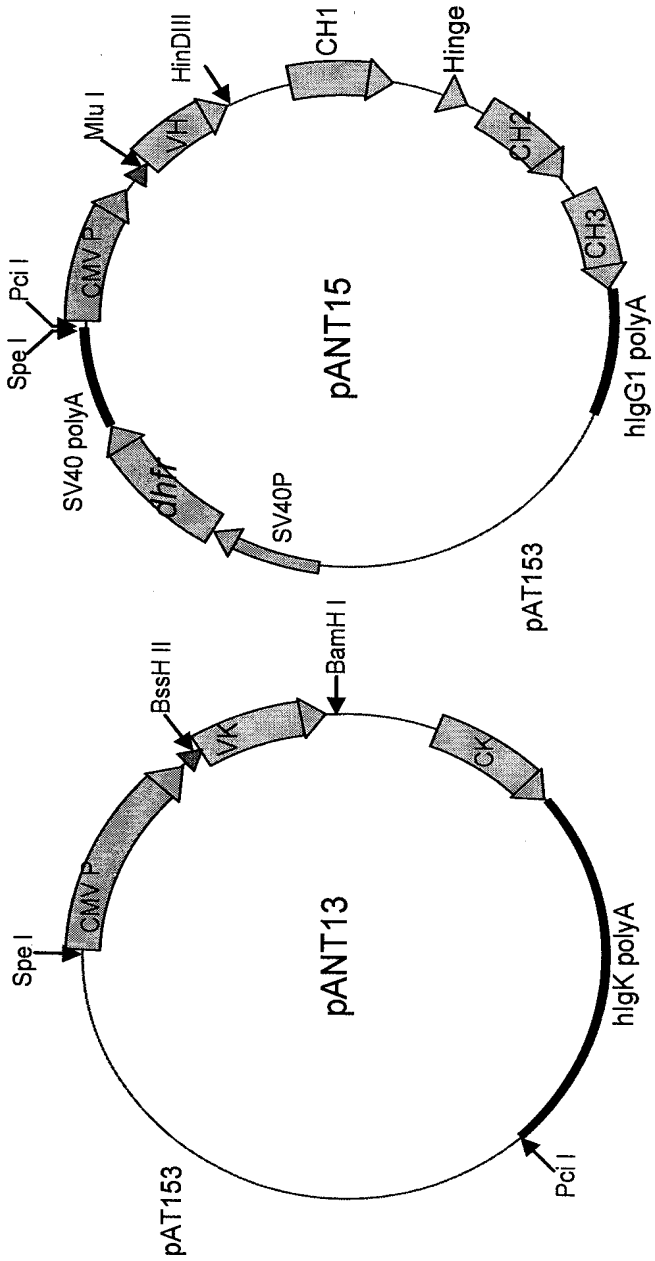
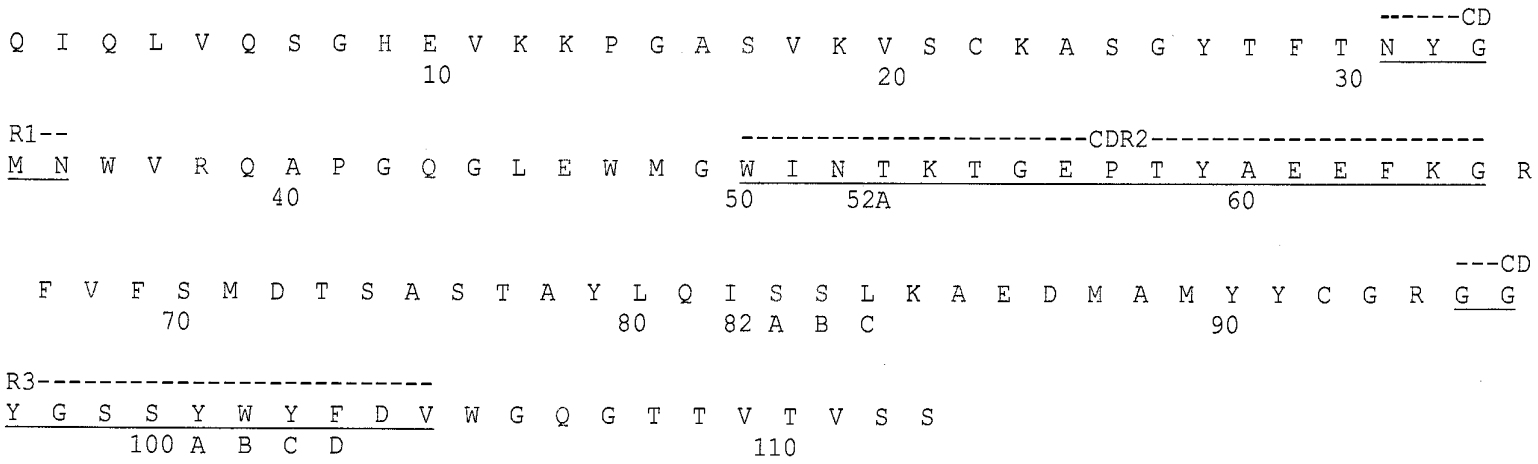

pANT15
pAT153
Spe I
Pci I
CMV P
Mlu I
HinDIII
VH
CH1
Hinge
CH2
CH3
hIgG1 polyA
SV40 polyA
dhfr
SV40P
pANT13
pAT153
Spe I
CMV P
BssH II
VK
BamH I
CK
hIgK polyA
Pci I

FIGURE 22A

Heavy chain HV6:



Heavy Chain HV5:

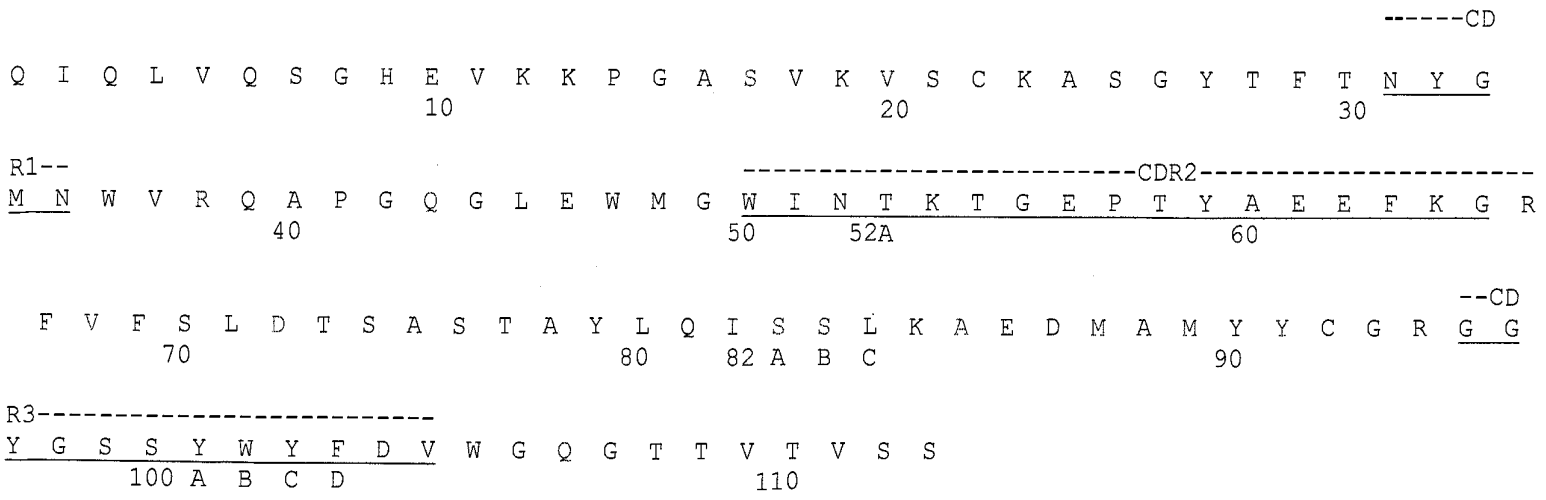
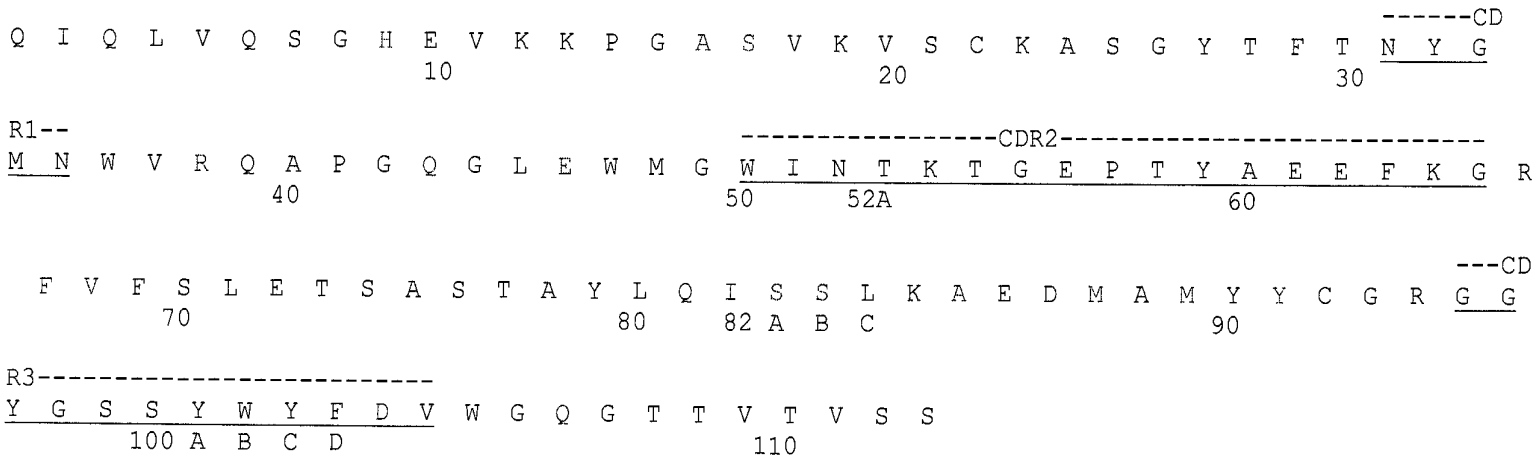


FIGURE 22B

Heavy Chain HV4:



Heavy Chain HV3:

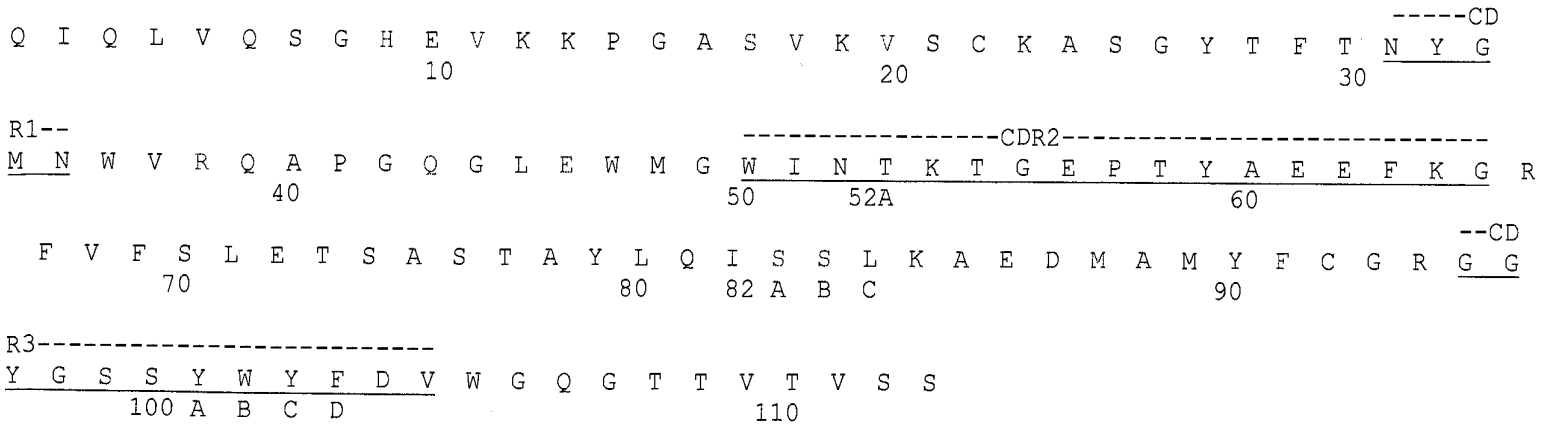


FIGURE 22C

Heavy Chain HV2:

```
                                                                                                  ------CD
 Q  I  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  K  P  G  A  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  N  Y  G
                           10                                20                                30

R1--                                                  ----------------------CDR2----------------------
M  N  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  N  T  K  T  G  E  P  T  Y  A  E  E  F  K  G  R
                  40                                50      52A                       60

                                                                                                  --CD
   F  V  F  S  L  E  T  S  A  S  T  A  Y  L  Q  I  S  S  L  K  A  E  D  T  A  M  Y  F  C  G  R  G  G
            70                                80     82 A  B  C                 90

R3-------------------------
Y  G  S  S  Y  W  Y  F  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
         100 A  B  C  D                    110
```

Heavy Chain HV1:

```
                                                                                                  - ----CD
Q  I  Q  L  V  Q  S  G  P  E  L  K  K  P  G  A  S  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  N  Y  G
                           10                                20                                30

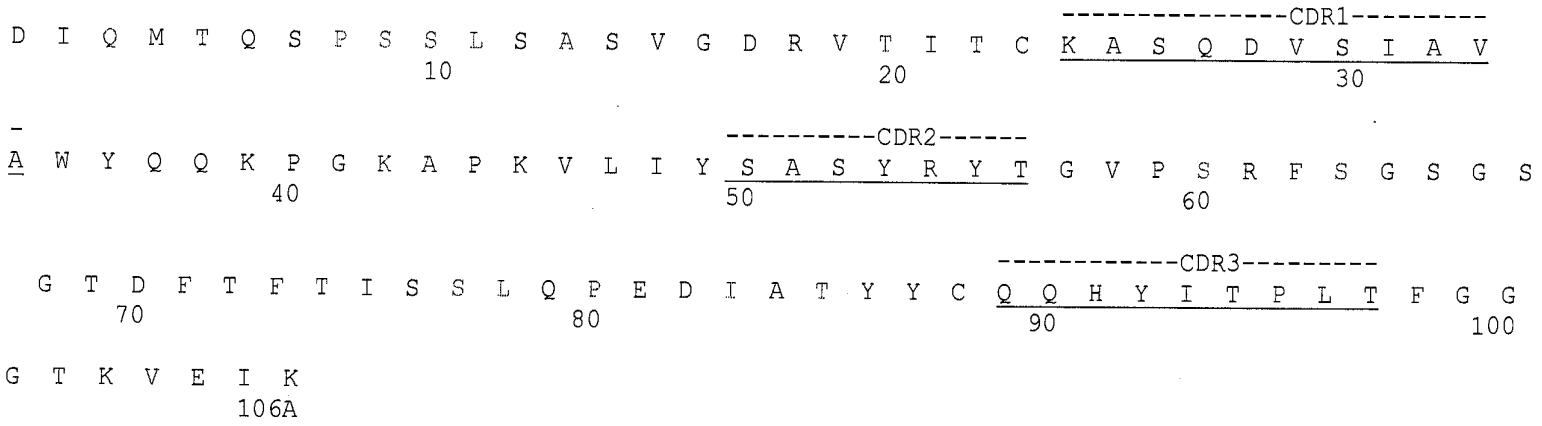
R1--                                                  ----------------------CDR2----------------------
M  N  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  M  G  W  I  N  T  K  T  G  E  P  T  Y  A  E  E  F  K  G  R
                  40                                50      52A                       60

                                                                                                  --CD
   F  V  F  S  L  E  T  S  A  S  T  A  Y  L  Q  I  S  S  L  K  A  E  D  M  A  M  Y  F  C  G  R  G  G
            70                                80     82 A  B  C                 90

R3-------------------------
Y  G  S  S  Y  W  Y  F  D  V  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
                     100 A  B  C  D                    110
```

FIGURE 23A

Light Chain KV5:



Light Chain KV4:

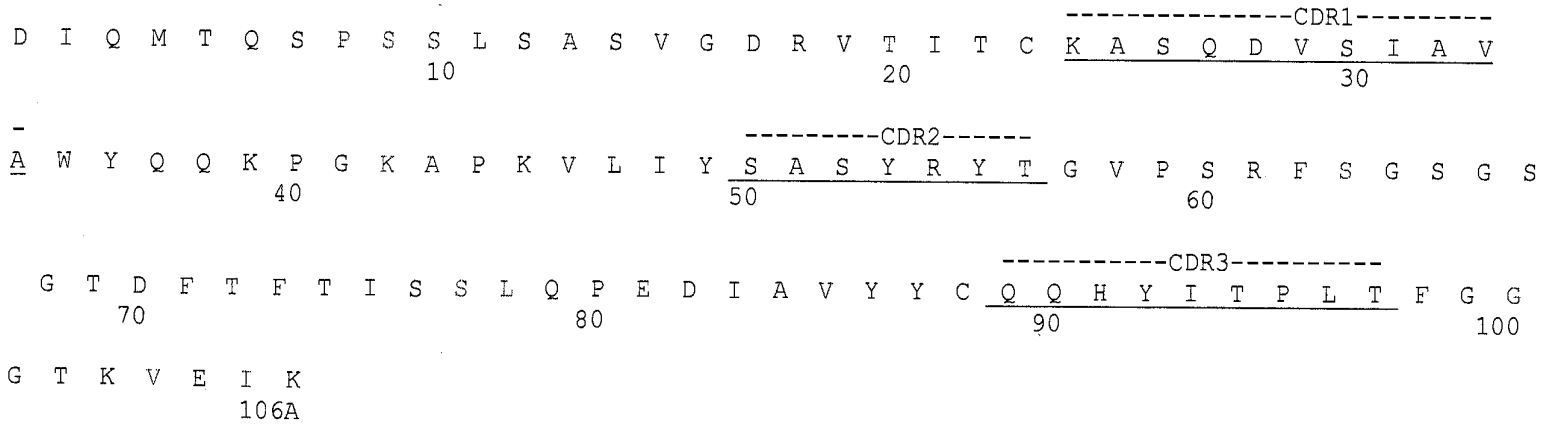
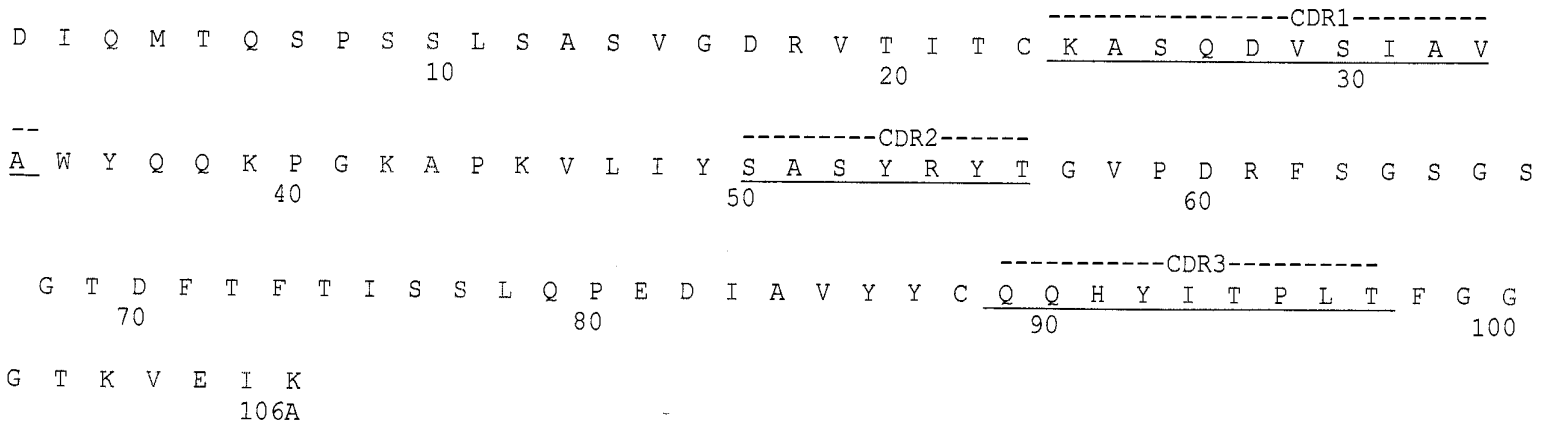


FIGURE 23B

Light Chain KV3:



Light Chain KV2:

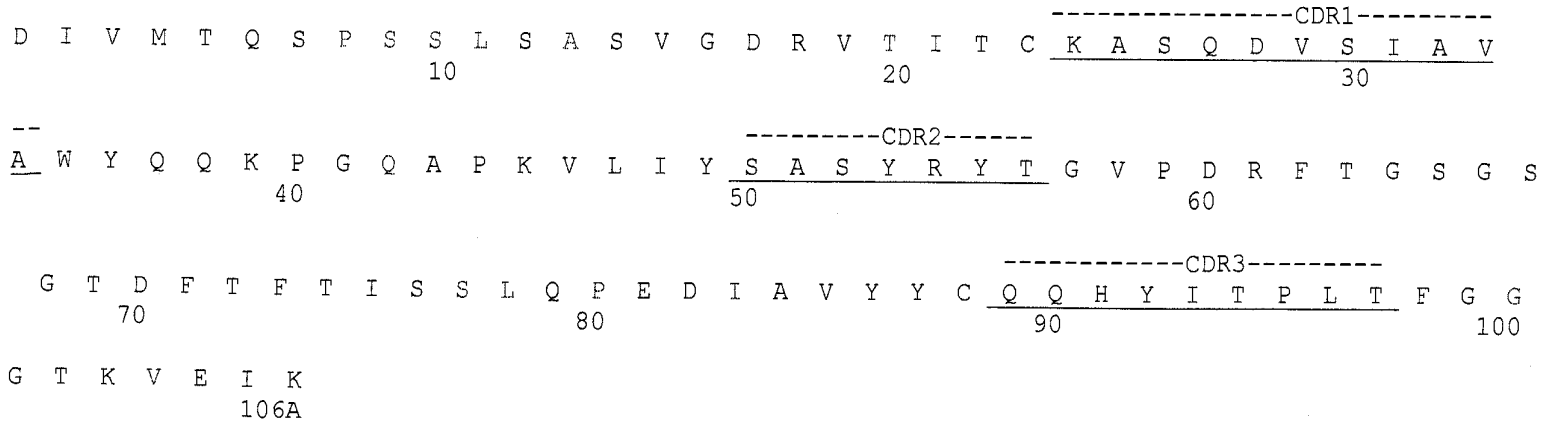


FIGURE 23C

Light Chain KV1:

```
                                                          ----------------CDR1---------
D I V M T Q S P S F L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S I A V
                  10                  20                  30
--                                    ----------CDR2------
A W Y Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y T G V P D R F T G S G S
          40                    50                    60
                                                        ------------CDR3---------
 G T D F T F T I S S L Q A E D I A V Y Y C Q Q H Y I T P L T F G G
   70                  80                  90                100
G T K V E I K
          106A
```

FIGURE 24

Matrix: ratio observed binding/expected

	VH0	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5	VH6
VK0	0.963	1.068	0.965	0.916	1.574	1.579	4.836
VK1	0.965	1.029	0.997	1.025	1.689	1.873	4.366
VK2	1.158	1.189	1.067	1.077	1.732	1.885	4.489
VK3	1.015	0.989	1.142	1.057	1.825	1.788	3.853
VK4	1.047	1.118	0.946	1.032	1.701	1.687	4.122
VK5	1.291	1.248	1.334	1.844	1.968	1.969	4.269

FIGURE 25

Antibody	KD (M)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
AR47A6.4.2*	3.03E-09	1.29E+05	3.81E-04
(hu)AR47A6.4.2 Variant HV2/KV3	6.90E-10	2.86E+05	1.97E-04
(hu)AR47A6.4.2 Variant HV2/KV4	6.97E-10	3.01E+05	2.10E-04
(hu)AR47A6.4.2 Variant HV3/KV3	6.13E-10	2.89E+05	1.77E-04
(hu)AR47A6.4.2 Variant HV3/KV4	6.31E-10	2.83E+05	1.78E-04

* Average of 3 independent experiments

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/000979

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC: ***C07K 16/30*** (2006.01), ***A61K 39/395*** (2006.01), ***A61K 47/48*** (2006.01), ***A61K 51/10*** (2006.01), ***A61P 35/00*** (2006.01), ***A61P 37/04*** (2006.01), ***C07K 16/28*** (2006.01), ***C07K 16/46*** (2006.01), ***C12P 21/08*** (2006.01), ***G01N 33/574*** (2006.01), ***G01N 33/577*** (2006.01)

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC: ***C07K 16/30*** (2006.01), ***A61K 39/395*** (2006.01), ***A61K 47/48*** (2006.01), ***A61K 51/10*** (2006.01), ***A61P 35/00*** (2006.01), ***A61P 37/04***

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic database(s) consulted during the international search (name of database(s) and, where practicable, search terms used)
Databases: Canadian Patent Database, Delphion, USPTO, QWEB, CAPlus, Genome Quest, Pubmed and Scopus. **Keywords**: TROP-2, EGP-1, GA733-1, antibody, hybridoma, AR47A6.4.2, 141205-05, humanized, CDMAB, chimeric, inhibit*, cancer, Arius, Young

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2003/074566 A2 (IMMUNOMEDICS INC) 12 September 2003 Whole document	38, 39 and 48 - 60
X, P, &	US 2007/0202113 A1 (ARIUS RESEARCH INC.) 30 August 2007 Whole document - cited in the description as US Application No. 11/709,676 -	1 - 60
X, P, &	US 2007/0202043 A1 (ARIUS RESEARCH INC.) 30 August 2007 Whole document	1 - 60

[ ] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 July 2008 (22-07-2008)	14 August 2008 (14-08-2008)

Name and mailing address of the ISA/CA	Authorized officer
Canadian Intellectual Property Office Place du Portage I, C114 - 1st Floor, Box PCT 50 Victoria Street Gatineau, Quebec K1A 0C9 Facsimile No.: 001-819-953-2476	Jacinth Abraham 819- 934-7598

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CA2008/000979

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of the first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons :

1. [X] Claim Nos. : 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely :

Claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47 are directed to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy which the International Search Authority is not required to search. However, this Authority has carried out a search based on the alleged effects or purposes/uses of the product defined in claims 1 - 21, 23 - 28, 30 - 37 and 40 - 47.

2. [ ] Claim Nos. :

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically :

3. [ ] Claim Nos. :

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows :

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claim Nos. :

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim Nos. :

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CA2008/000979

Patent Document Cited in Search Report	Publication Date	Patent Family Member(s)	Publication Date
WO 2003074566 A2	12-09-2003	AU 2003209447A1	16-09-2003
		CA 2478047A1	12-09-2003
		CN 1649903A	03-08-2005
		CN 100360567C	09-01-2008
		EP 1483295A2	08-12-2004
		IL 163852D0	18-12-2005
		JP 2006502698T	26-01-2006
		US 7238785B2	03-07-2007
		US 2004001825A1	01-01-2004
		US 2007212350A1	13-09-2007
		US 2008131363A1	05-06-2008
		WO 03074566A3	04-03-2004
US 2007202113A1	30-08-2007	US 2007202043A1	30-08-2007
		US 2008131428A1	05-06-2008
		WO 2007095748A1	30-08-2007
		WO 2007095749A1	30-08-2007
US 2007202043A1	30-08-2007	US 2007202113A1	30-08-2007
		US 2008131428A1	05-06-2008
		WO 2007095748A1	30-08-2007
		WO 2007095749A1	30-08-2007

OnCusp
Ex. 1038

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
27 January 2011 (27.01.2011)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2011/011474 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 31/44* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2010/042686

(22) International Filing Date:
21 July 2010 (21.07.2010)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/227,599 22 July 2009 (22.07.2009) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **Enzon Pharmaceuticals, Inc.** [US/US]; 685 Route 202/206, Bridgewater, New Jersey 08807 (US).

(72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant *(for US only)*: **SAPRA, Puja** [IN/US]; 254 Wayne Avenue, River Edge, New Jersey 07661 (US).

(74) Agent: **Mercanti, Michael N.**; Lucas & Mercanti, LLP, 475 Park Avenue South, 15th Floor, New York, New York 10016 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

WO 2011/011474 A1

(54) Title: METHODS OF TREATING HER2 POSITIVE CANCER WITH HER2 RECEPTOR ANTAGONIST IN COMBINATION WITH MULTI-ARM POLYMERIC CONJUGATES OF 7-ETHYL-10-HYDROXYCAMPTOTHECIN

(57) Abstract: The present invention relates to methods of treating a HER2 positive cancer in mammals. The present invention includes administering a HER2 antagonist in combination with a polymeric prodrug of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin to the mammals in need thereof.

METHODS OF TREATING HER2 POSITIVE CANCER WITH HER2 RECEPTOR ANTAGONIST IN COMBINATION WITH MULTI-ARM POLYMERIC CONJUGATES OF 7-ETHYL-10-HYDROXYCAMPTOTHECIN

CROSS-REFERENCE TO RELATED APPLICATION

This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent Application Serial No. 61/227,599, filed July 22, 2009, the contents of which are incorporated herein by reference.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to methods of treating a HER2 positive cancer. In particular, the invention relates to methods of treating a HER2 positive cancer in a mammal by administering a HER2 antagonist in combination with polyethylene glycol conjugates of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Breast cancer is the most common type of cancer among women in the United States. Recent studies show that approximately 20-25% of breast cancers are HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) positive. The HER2 protein, also called the HER2 receptor or HER2/neu or ErbB2, is found on the surface of some normal cells in the body. HER2 plays a role in regulating cell growth and survival. HER2 protein, encoding genes and antibodies to HER2 protein are described in detail in U.S. Patent No. 6,165,464, incorporated by reference herein in its entirety.

Studies show that breast cancer may be more aggressive when the breast cancer tumors over-express the HER2 protein. HER2 positive tumors grow and spread more quickly than tumors that are not HER2 positive. In HER2 positive breast cancer, the cancer cells have an abnormally high number of HER2 gene copies per cell. See *Slamon DJ. et al.*, Science 244:707-712, 1989; and *Pegram M. et al.*, Semin. Oncol. 27: 13-19. 2000. It has been reported that HER positive breast cancer recurs 2.5 times more than non-HER2 positive cancer. It has also been suggested that HER2 overexpression is associated with resistance to chemotherapeutic agents.

Trastuzumab is a humanized monoclonal antibody which binds selectively to the domain IV of HER2 (or HER2/neu) receptor. Trastuzumab inhibits tumor cell growth by

binding to the HER2 protein. Clinical studies showed that the use of trastuzumab reduced the risk of a relapse among those with the aggressive HER2 positive cancer by more than half.

There have been various trials to treat cancer with trastuzumab in combination with chemotherapeutic agents in an attempt to achieve synergistic effects or reduce side effects of therapeutic agents. To name a few, the combination therapy with trastuzumab includes docetaxel/gefitinib/trastuzumab, capecitabine/paclitaxel/trastuzumab, carboplatin/docetaxel/trastuzumab, carboplatin/gemcitabine/paclitaxel/trastuzumab, carboplatin/paclitaxel/trastuzumab, cisplatin/docetaxel/trastuzumab, cyclophosphamide/doxorubicin/trastuzumab, cyclophosphamide/fluorouracil/methotrexate/trastuzumab, etc. See also, for example, U.S. Patent Nos. 6,313,138; 6,462,017; 6,537,988; and 6,846,816. It has been shown that trastuzumab in combination with chemotherapy extended survival in women both in early stage and late stage metastatic cancer. For example, median survival increased to 26.2 months for patients receiving trastuzumab and chemotherapy, compared with 20.0 months patients receiving chemotherapy alone.

Unfortunately, patients need to receive trastuzumab therapy over a long period of time such as a year. Such long term treatment with trastuzumab has adverse effects. There have been reports that the treatment with trastuzumab alone or in combination with chemotherapy has resulted in heart failure. It is also reported that it is dangerous for patients to receive trastuzumab in combination with anthracycline-based chemotherapy. A significant number of patients receiving trastuzumab in combination with chemotherapeutic agents such as doxorubicin, cyclophosphamide, and either paclitaxel or docetaxel developed heart failure. As such, trastuzumab-associated therapy requires patients to have their heart function test prior to and during trastuzumab-associated therapy and it is recommended that patients with heart problems not receive or stop trastuzumab-associated therapy. The prolonged use of tratuzumab may also worsen chemotherapy-induced neutropenia.

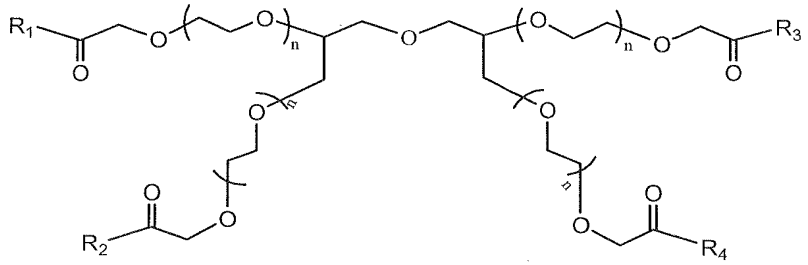
Thus, there continues to be a need for methods for treating a HER2 positive cancer. The present invention addresses this need.

SUMMARY OF THE INVENTION

In one aspect of the present invention, there is provided a method of treating a HER2 positive cancer in a mammal. The method includes administering a HER2 receptor

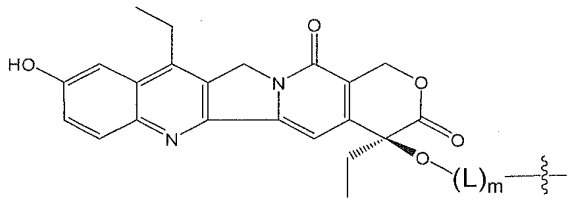
antagonist to the mammal in combination with an effective amount of a compound of Formula (I):

(I)



wherein

R_1, R_2, R_3 and R_4 are independently OH or



wherein

L is a bifunctional linker, and each L is the same or different, when (m) is equal to or greater than 2;

(m) is 0 or a positive integer; and

(n) is a positive integer;

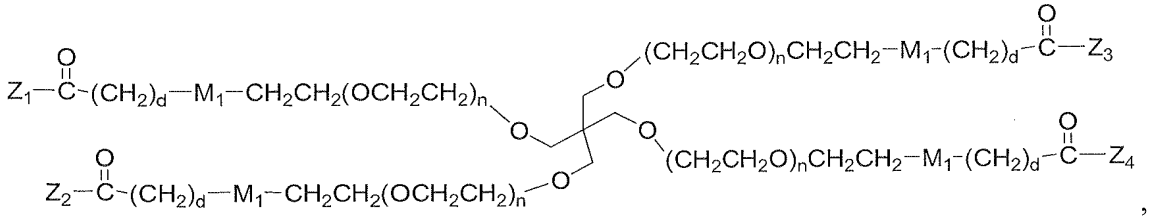
provided that R_1, R_2, R_3 and R_4 are not all OH;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof to the mammal.

In an alternative aspect, there is provided a method of treating a HER2 positive cancer in a mammal. The method includes administering to said mammal a HER2 receptor antagonist in combination with an effective amount of a camptothecin, a camptothecin analog, a polymeric conjugate of a camptothecin or analog thereof, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

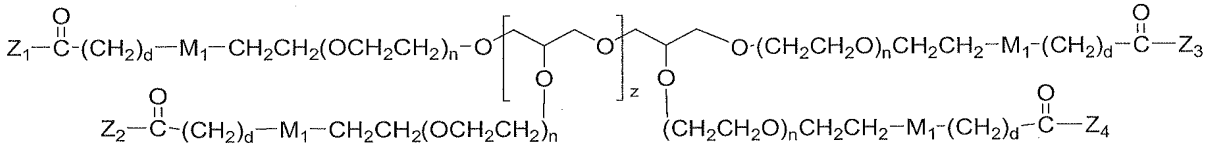
In one embodiment, the method is conducted by administering a HER2 receptor antagonist plus a polymeric conjugate of a camptothecin or analog thereof to a mammal having a HER2 positive cancer. The polymeric conjugate includes a compound of Formula (II) or (III):

(II)



or

(III)



,

wherein

Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are independently OH or $(L)_m$-D;

L is a bifunctional linker;

D is a camptothecin or a camptothecin analog;

M_1 is O, S, or NH;

(d) is zero or a positive integer of from about 1 to about 10;

(z) is zero or a positive integer of from 1 to about 29;

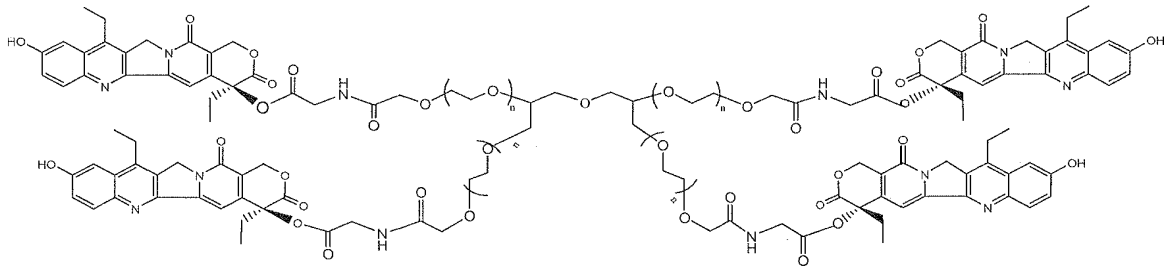
(m) is 0 or a positive integer, wherein each L is the same or different when (m) is equal to or greater than 2; and

(n) is a positive integer of from about 10 to about 2,300 so that the polymeric portion of the compound has the total number average molecular weight of from about 2,000 to about 100,000 daltons,

provided that Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are not all OH.

In one embodiment, the HER2 antagonist employed in the methods described herein includes trastuzumab marketed under the trademark Herceptin®, as described in detail by U.S. Patent Nos. 5,821,337 and 6,165,464, incorporated by reference herein.

In one preferred embodiment, the polymeric prodrugs of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin employed in the methods described herein include four-arm PEG-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin conjugates having the structure of



wherein (n) is from about 28 to about 341, preferably from about 114 to about 239, and more preferably about 227.

In yet another embodiment, the method described herein includes:

(a) determining the presence of HER2 positive cancer in a mammal having a cancer; and

(b) administering an effective amount of a HER2 receptor antagonist in combination with an effective amount of a compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) to a mammal having a HER2 positive cancer.

In another aspect, the present invention provides a method of increasing HER2 receptor antagonist effects in a mammal having a HER2 positive cancer.

In yet another aspect, the present invention provides a method of inhibiting the growth or proliferation of HER2 positive cells, as well as a method of delivering a camptothecin such as 7-ethyl-10-hydroxycomptothecin to a HER2 positive cell in a mammal.

One advantage of the present invention is that the present invention provides a means to utilize HER2 antagonist-based therapy effectively for the treatment of patients who did not respond to HER2 antagonist-containing therapy, or patients who initially responded but later developed resistance to a HER2 antagonist. Patients can benefit from unexpected lack and/or reduction in resistance to a HER2 antagonist such as trastuzumab and pertuzumab.

Another advantage is that the present invention provides a means to treat patients with poor prognosis. HER2 is considered to be correlated with drug resistance and overall poor prognosis. A HER2 antagonist, when administered with the compounds of Formula (I) (alternatively compounds of Formula (II) or (III)) described herein according to the present invention is significantly effective in inhibiting tumor growth and/or proliferation, compared to treatments in which a HER2 antagonist is not administered in combination with the compounds described herein.

Yet another advantage is that the present invention increases the therapeutic efficacy of a HER2 antagonist, and allows certain patients in need to receive HER2-associated therapy

for a lesser period or amount, when compared to HER2 therapy alone. Any side-effects associated with or which result from HER2-associated therapy can be alleviated by the enhanced efficacy of HER2 antagonist therapy.

Further advantages will be apparent from the following description and drawings.

For purposes of the present invention, "HER2 positive cancer" and "HER2 over-expressing cancer" are used interchangeably. In HER2-positive cancer cells, there is an excess amount of the HER2 protein on the cell surface and/or amplification of the encoding *HER2/neu* gene. Levels of HER2 expression can be measured by techniques known in the art, as well as those methods described later. HER2 positive cancer has greater expression of the HER2 protein or gene, as compared to non-HER2 positive cancer or normal cells or tissues. For example, HER2 is determined by immunohistochemical ("IHC") assays that measure the amount of HER2 protein expressed on the surface of cancer cells. IHC assays are scored on a scale of 0 to 3+ based on the staining intensity and completeness of cell membrane staining. For example, a cancer that scores 3+ on an IHC assay is considered to be HER2 positive cancer. A cancer that scores 2+ on an IHC assay may be further tested by a fluorescence in-situ hybridization ("FISH") assay, where a positive FISH assay confirms that the cancer is HER2 positive. A FISH assay measures the number of HER2/neu gene copies present in cancer cells. FISH test results are provided by the ratio of the number of HER2 signals to the number of chromosome 17 signals among 20 interphase nuclei in tumor cells. Normal specimens show a ratio of <2.0, while specimens with amplification of HER2/neu have a ratio of greater than or equal to 2.0 and are defined as HER2-positive (FISH +).

The terms "HER2 receptor antagonist" and "HER2 antagonist" refer to compounds which inhibit expression or function of the HER2 protein or gene. For purposes of the present invention, a HER2 antagonist refers to, e.g., receptor tyrosine kinase inhibitors, especially HER2 receptor protein inhibitors. Simply by way of example, HER2 antagonists include anti-HER2 antibodies. The definition of HER2 antagonists is also intended to include antisense HER2 oligonucleotides.

For purposes of the present invention, the term "adjuvant treatment" refers to treatment given in addition to the primary (initial) treatment. Adjuvant treatment is an additional treatment designed to help reach the ultimate goal.

For purposes of the present invention, the term "early" or "early-stage" breast cancer means that the cancer has not spread beyond the breast or lymph nodes under the arm (known

as axillary lymph nodes). Stage 0, I, and II, as well as some stage III cancers, are usually considered early-stage.

For purposes of the present invention, refractory or resistant cancers are defined as cancers that have not responded to previous anticancer therapy or treatment which does not include the compounds of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)) described herein. In one aspect, the cancers are resistant or refractory to a HER2 receptor antagonist such as HER2 antibodies (e.g. trastuzumab and pertuzumab) when used alone or in combination with chemotherapy which does not include the compound of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)). In one embodiment, the cancers are refractory or resistant to Herceptin® treatment alone, or to Herceptin® plus chemotherapy which does not include the compounds of Formula (I) described herein. The cancers can be refractory or resistant at the beginning of treatment, or they may become refractory or resistant during/after treatment. Thus, refractory cancers include tumors that do not respond at the onset of treatment or respond initially for a short period but fail to respond to treatment. Refractory cancers also include tumors that respond to treatment with anticancer therapy but fail to respond to subsequent rounds of therapies. For the purposes of this invention, refractory cancers can also encompass tumors that appear to be inhibited by treatment with anticancer therapy but recur up to five years, sometimes up to ten years or longer, after treatment is discontinued. The anticancer therapy can employ chemotherapeutic agents alone, radiation alone or combinations thereof. For ease of description and not limitation, it will be understood that the refractory cancers are interchangeable with resistant cancers.

For purposes of the present invention, successful treatment of a refractory or resistant cancer shall be understood to mean that refractory or resistant symptoms or conditions are inhibited, minimized or attenuated during and/or after the combination treatment described herein, when compared to that observed in the absence of the combination treatment described herein. The minimized, attenuated or inhibited refractory conditions can be confirmed by clinical markers contemplated by the artisan in the field. In one example, successful treatment of refractory or resistant cancer shall be deemed to occur when at least 5 % or preferably 10%, more preferably 20% or higher (i.e., 30, 40, 50 % or more) inhibition or decrease in tumor growth and/or recurrence including other clinical markers contemplated by the artisan in the field is realized when compared to that observed in the absence of the treatment described herein. Clinical markers which show changes in the severity and magnitude of the refractory cancers can be determined by clinicians.

For purposes of the present invention, the terms "cancer" and "tumor" are used interchangeably, unless otherwise indicated. Cancer encompasses benign, malignant and/or metastatic cancer, unless otherwise indicated. Cancers may be more aggressive or less aggressive. The aggressive phenotype refers to the proliferation rate and the ability to form tumors and metastasize. Aggressive cancers proliferate more quickly, and form tumors and metastasize more easily, as compared to less-aggressive tumors.

For purposes of the present invention, "treatment of tumor/cancer" shall be understood to mean inhibition, reduction, or amelioration of tumor growth, tumor burden and metastasis, remission of tumor, or inhibition of recurrences of tumor and/or neoplastic growths realized in patients after completion of the combination therapy described herein, as compared to patients who have not received the combination treatment described herein. Successful treatment is deemed to occur when a patient achieves positive clinical results. For example, successful treatment of a tumor shall be deemed to occur when at least 10% or preferably 20%, more preferably 30 % or higher (i.e., 40%, 50%) decrease in tumor growth including other clinical markers contemplated by the artisan in the field is realized when compared to that observed in the absence of the combination treatment described herein. Other methods for determining changes in a tumor clinical status resulting from the treatment described herein include: biopsies such as a tumor biopsy, an immunohistochemistry study using antibody, radioisotope, dye, and complete blood count (CBC).

For purposes of the present invention, diseases or disorders associated with HER2 over-expression contemplated according to the present invention include conditions in which the HER2 protein or gene plays a role in the pathology or progression of the condition.

The terms "effective amounts" and "sufficient amounts" for purposes of the present invention shall mean an amount which achieves a desired effect or therapeutic effect as such effect is understood by those of ordinary skill in the art. An effective amount for each mammal or human patient to be treated is readily determined by the artisan in a range that provides a desired clinical response while avoiding undesirable effects that are inconsistent with good practice. Dose ranges are provided hereinbelow.

For purposes of the present invention, the term "residue" shall be understood to mean that portion of a compound, to which it refers, e.g., 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, amino acid, etc. that remains after it has undergone a substitution reaction with another compound.

For purposes of the present invention, the term "polymeric residue" or "PEG residue" shall each be understood to mean that portion of the polymer or PEG which remains after it

has undergone a reaction with, e.g., an amino acid, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin-containing compounds.

For purposes of the present invention, the term "alkyl" refers to a saturated aliphatic hydrocarbon, including straight-chain, branched-chain, and cyclic alkyl groups. The term "alkyl" also includes alkyl-thio-alkyl, alkoxyalkyl, cycloalkylalkyl, heterocycloalkyl, and C_{1-6} alkylcarbonylalkyl groups. Preferably, the alkyl group has 1 to 12 carbons. More preferably, it is a lower alkyl of from about 1 to 7 carbons, yet more preferably about 1 to 4 carbons. The alkyl group can be substituted or unsubstituted. When substituted, the substituted group(s) preferably include halo, oxy, azido, nitro, cyano, alkyl, alkoxy, alkyl-thio, alkyl-thio-alkyl, alkoxyalkyl, alkylamino, trihalomethyl, hydroxyl, mercapto, hydroxy, cyano, alkylsilyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, heterocycloalkyl, heteroaryl, alkenyl, alkynyl, C_{1-6} hydrocarbonyl, aryl, and amino groups.

For purposes of the present invention, the term "substituted" refers to adding or replacing one or more atoms contained within a functional group or compound with one of the moieties from the group of halo, oxy, azido, nitro, cyano, alkyl, alkoxy, alkyl-thio, alkyl-thio-alkyl, alkoxyalkyl, alkylamino, trihalomethyl, hydroxyl, mercapto, hydroxy, cyano, alkylsilyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, heterocycloalkyl, heteroaryl, alkenyl, alkynyl, C_{1-6} alkylcarbonylalkyl, aryl, and amino groups.

For purposes of the present invention, the term "alkenyl" refers to groups containing at least one carbon-carbon double bond, including straight-chain, branched-chain, and cyclic groups. Preferably, the alkenyl group has about 2 to 12 carbons. More preferably, it is a lower alkenyl of from about 2 to 7 carbons, yet more preferably about 2 to 4 carbons. The alkenyl group can be substituted or unsubstituted. When substituted the substituted group(s) include halo, oxy, azido, nitro, cyano, alkyl, alkoxy, alkyl-thio, alkyl-thio-alkyl, alkoxyalkyl, alkylamino, trihalomethyl, hydroxyl, mercapto, hydroxy, cyano, alkylsilyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, heterocycloalkyl, heteroaryl, alkenyl, alkynyl, C_{1-6} hydrocarbonyl, aryl, and amino groups.

For purposes of the present invention, the term "alkynyl" refers to groups containing at least one carbon-carbon triple bond, including straight-chain, branched-chain, and cyclic groups. Preferably, the alkynyl group has about 2 to 12 carbons. More preferably, it is a lower alkynyl of from about 2 to 7 carbons, yet more preferably about 2 to 4 carbons. The alkynyl group can be substituted or unsubstituted. When substituted the substituted group(s) include halo, oxy, azido, nitro, cyano, alkyl, alkoxy, alkyl-thio, alkyl-thio-alkyl, alkoxyalkyl,

alkylamino, trihalomethyl, hydroxyl, mercapto, hydroxy, cyano, alkylsilyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, heterocycloalkyl, heteroaryl, alkenyl, alkynyl, C_{1-6} hydrocarbonyl, aryl, and amino groups. Examples of "alkynyl" include propynyl (i.e., propargyl), and 3-hexynyl.

For purposes of the present invention, the term "aryl" refers to an aromatic hydrocarbon ring system containing at least one aromatic ring. The aromatic ring can optionally be fused or otherwise attached to other aromatic hydrocarbon rings or non-aromatic hydrocarbon rings. Examples of aryl groups include, for example, phenyl, naphthyl, 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene and biphenyl. Preferred examples of aryl groups include phenyl and naphthyl.

For purposes of the present invention, the term "cycloalkyl" refers to a C_{3-8} cyclic hydrocarbon. Examples of cycloalkyl include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, cycloheptyl and cyclooctyl.

For purposes of the present invention, the term "cycloalkenyl" refers to a C_{3-8} cyclic hydrocarbon containing at least one carbon-carbon double bond. Examples of cycloalkenyl include cyclopentenyl, cyclopentadienyl, cyclohexenyl, 1,3-cyclohexadienyl, cycloheptenyl, cycloheptatrienyl, and cyclooctenyl.

For purposes of the present invention, the term "cycloalkylalkyl" refers to an alklyl group substituted with a C_{3-8} cycloalkyl group. Examples of cycloalkylalkyl groups include cyclopropylmethyl and cyclopentylethyl.

For purposes of the present invention, the term "alkoxy" refers to an alkyl group of indicated number of carbon atoms attached to the parent molecular moiety through an oxygen bridge. Examples of alkoxy groups include, for example, methoxy, ethoxy, propoxy and isopropoxy.

For purposes of the present invention, an "alkylaryl" group refers to an aryl group substituted with an alkyl group.

For purposes of the present invention, an "aralkyl" group refers to an alkyl group substituted with an aryl group.

For purposes of the present invention, the term "alkoxyalkyl" group refers to an alkyl group substituted with an alkloxy group.

For purposes of the present invention, the term "amino" refers to a nitrogen containing group as is known in the art derived from ammonia by the replacement of one or more hydrogen radicals by organic radicals. For example, the terms "acylamino" and

"alkylamino" refer to specific N-substituted organic radicals with acyl and alkyl substituent groups respectively.

For purposes of the present invention, the term "halogen' or "halo" refers to fluorine, chlorine, bromine, and iodine.

For purposes of the present invention, the term "heteroatom" refers to nitrogen, oxygen, and sulfur.

For purposes of the present invention, the term "heterocycloalkyl" refers to a non-aromatic ring system containing at least one heteroatom selected from nitrogen, oxygen, and sulfur. The heterocycloalkyl ring can be optionally fused to or otherwise attached to other heterocycloalkyl rings and/or non-aromatic hydrocarbon rings. Preferred heterocycloalkyl groups have from 3 to 7 members. Examples of heterocycloalkyl groups include, for example, piperazine, morpholine, piperidine, tetrahydrofuran, pyrrolidine, and pyrazole. Preferred heterocycloalkyl groups include piperidinyl, piperazinyl, morpholinyl, and pyrrolidinyl.

For purposes of the present invention, the term "heteroaryl" refers to an aromatic ring system containing at least one heteroatom selected from nitrogen, oxygen, and sulfur. The heteroaryl ring can be fused or otherwise attached to one or more heteroaryl rings, aromatic or non-aromatic hydrocarbon rings or heterocycloalkyl rings. Examples of heteroaryl groups include, for example, pyridine, furan, thiophene, 5,6,7,8-tetrahydroisoquinoline and pyrimidine. Preferred examples of heteroaryl groups include thienyl, benzothienyl, pyridyl, quinolyl, pyrazinyl, pyrimidyl, imidazolyl, benzimidazolyl, furanyl, benzofuranyl, thiazolyl, benzothiazolyl, isoxazolyl, oxadiazolyl, isothiazolyl, benzisothiazolyl, triazolyl, tetrazolyl, pyrrolyl, indolyl, pyrazolyl, and benzopyrazolyl.

In some embodiments, substituted alkyls include carboxyalkyls, aminoalkyls, dialkylaminos, hydroxyalkyls and mercaptoalkyls; substituted alkenyls include carboxyalkenyls, aminoalkenyls, dialkenylaminos, hydroxyalkenyls and mercaptoalkenyls; substituted alkynyls include carboxyalkynyls, aminoalkynyls, dialkynylaminos, hydroxyalkynyls and mercaptoalkynyls; substituted cycloalkyls include moieties such as 4-chlorocyclohexyl.

For purposes of the present invention, "positive integer" shall be understood to include an integer equal to or greater than 1 (e.g., an integer from about 1 to about 10, from about 1 to about 6) and as will be understood by those of ordinary skill to be within the realm of reasonableness by the artisan of ordinary skill.

For purposes of the present invention, the term "linked" shall be understood to include covalent (preferably) or noncovalent attachment of one group to another, i.e., as a result of a chemical reaction.

For purposes of the present invention, the terms, "nucleic acid" or "nucleotide" apply to deoxyribonucleic acid ("DNA"), ribonucleic acid, ("RNA") whether single-stranded or double-stranded, unless otherwise specified, and any chemical modifications thereof.

Preferably, a mammal to be treated according to the invention is a human.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

FIG. 1 illustrates the stability of 4arm-PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) as described in Example 4, in human plasma, phosphate buffer solution, and saline.

FIG. 2 illustrates the effect of pH on stability of 4arm-PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin) as described in Example 4.

FIG. 3A illustrates pharmacokinetic profiles of 4arm-PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin) as described in Example 5.

FIG. 3B illustrates pharmacokinetic profiles of 4arm-PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) as described in Example 5. Enterohepatic circulation of 4arm-PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) conjugates is indicated.

FIG. 4 illustrates the inhibition in tumor growth in mice xenografted with human JIMT-1 breast tumor that is refractory to Herceptin® and pertuzumab, as described in Example 6.

FIG. 5 illustrates the inhibition in tumor growth in mice xenografted with human N87 gastric cancer, as described in Example 7.

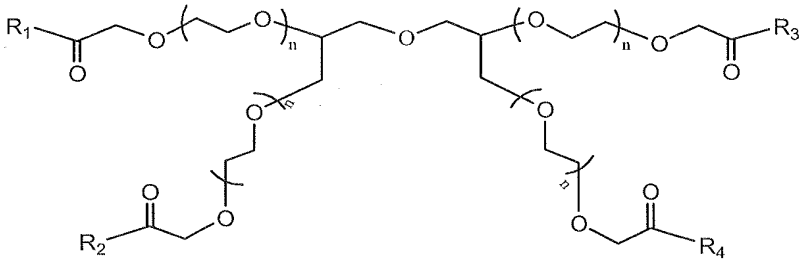
DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

A. OVERVIEW

In one aspect of the invention, there are provided methods of treating a HER2 positive cancer in a mammal. The method includes:

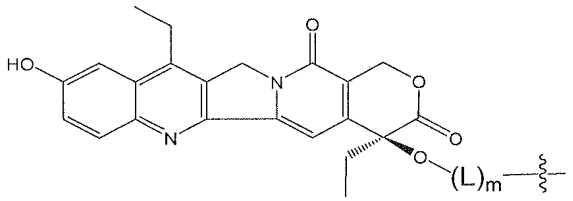
administering a HER2 receptor antagonist in combination with an effective amount of a compound of Formula (I):

(I)



wherein

R_1, R_2, R_3 and R_4 are independently OH or



wherein

L is a bifunctional linker;

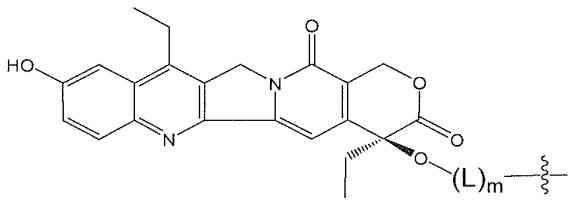
(m) is 0 or a positive integer, preferably zero or an integer from about 1 to about 10 (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6), wherein each L is the same or different when (m) is equal to or greater than 2; and

(n) is a positive integer;

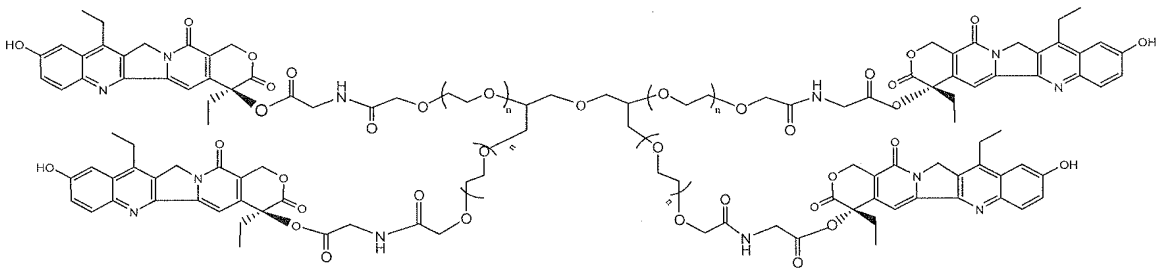
provided that R_1, R_2, R_3 and R_4 are not all OH;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, to said mammal.

In one preferred embodiment, the method includes administering, to the mammal, a HER2 receptor antagonist in combination with a compound of Formula (I) in which R_1, R_2, R_3 and R_4 are all:



In more preferred aspect, the method includes administering a HER2 receptor antagonist in combination with a compound of Formula (Ia):

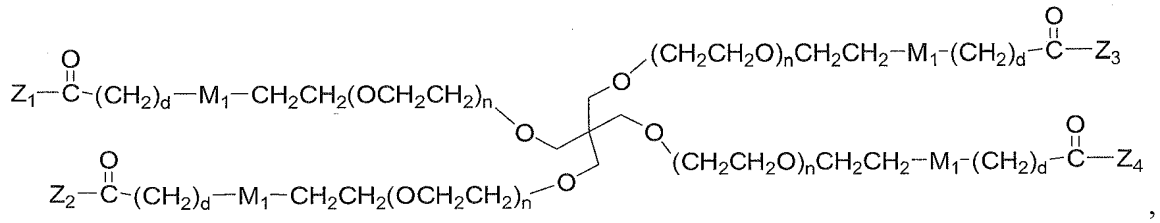


wherein (n) is about 227 so that the polymeric portion of the compound has the total number average molecular weight of about 40,000 daltons.

In an alternative aspect, there are provided methods of treating a HER2 positive cancer in a mammal. The method includes administering to said mammal a HER2 receptor antagonist in combination with an effective amount of a camptothecin, a camptothecin analog, a polymeric conjugate of a camptothecin or analog thereof, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In one embodiment, the method is conducted by administering a HER2 receptor antagonist plus a polymeric conjugate of a camptothecin or analog thereof to a mammal having a HER2 positive cancer. The polymeric conjugate includes a compound of Formula (II) or (III):

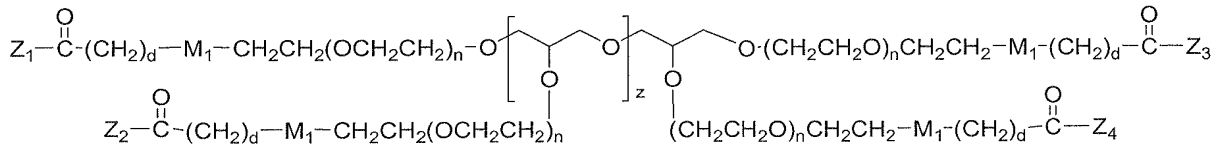
(II)



,

or

(III)



,

wherein

Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are independently OH or $(L)_m$-D;

L is a bifunctional linker;

D is a camptothecin or a camptothecin analog;

M_1 is O, S, or NH, preferably O;

(d) is zero or a positive integer of from about 1 to about 10, preferably, 0, 1, 2, or 3, and more preferably, 0 or 1;

(z) is zero or a positive integer of from 1 to about 29, preferably, 1, 5, 13 or 29;

(m) is 0 or a positive integer, preferably zero or an integer from about 1 to about 10 (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, 6), wherein each L is the same or different when (m) is equal to or greater than 2; and

(n) is a positive integer of from about 10 to about 2,300 so that the polymeric portion of the compound has the total number average molecular weight of from about 2,000 to about 100,000 daltons,

provided that Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are not all OH.

In one particular embodiment, SN38 is attached at its 20-OH position to the multi-armed polyethylene glycol of Formula (II) or (III) via the bifunctional linker such as glycine, alanine, methionine, etc. Alternatively, camptothecin, topotecan or CPT-11 is attached at its 20-OH position to the multi-armed polyethylene glycol of Formula (II) or (III) via the bifunctional linker such as glycine, alanine, methionine, sarcosine, etc.

The HER2 antagonist and the compound of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)) are administered in amounts which are sufficient to achieve a desired therapeutic effect.

The HER2 positive cancers which can be treated with the methods described herein include, but are not limited to, solid tumors, breast cancer, gastric cancer, ovarian cancer, stomach cancer, uterine cancer, uterine serous endometrial carcinoma, prostate cancer, bladder cancer, salivary gland carcinoma, renal adenocarcinoma, and mammary gland carcinoma. The forgoing list is not meant to be exclusive and those of ordinary skill will realize that other HER2 cancers not specifically mentioned herein are intended for inclusion.

The HER2 positive cancer can be metastatic or non-metastatic.

In one aspect, the methods described herein can be useful in the treatment of a HER2 positive cancer which is resistant or refractory to a HER2 receptor antagonist such as trastuzumab and pertuzumab when used alone or in combination with chemotherapy which does not include the compound of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)). The combination treatment described herein is also useful for the treatment of a HER2 positive cancer which is sensitive to the anti-HER2 antibodies. Without being bound by any theory, the methods described herein enhance therapeutic efficacy of HER2 antagonist and/or alleviate resistance to the HER2 receptor antagonists by HER2 positive cancer, when

compared to the treatment with the anti-HER2 antibodies without the compound of Formula (I) described herein.

In a further aspect, the method described herein includes a step of identifying a patient with a HER2 positive cancer.

In an alternate aspect, the present invention provides a method of treating a disease or disorder associated with higher levels of the HER2 protein or gene (e.g., gene expression), compared to that observed in a mammal with normal expression of HER2 (or without excessive expression of HER2). Pathological conditions which involve excessive expression of the HER2 protein or gene benefit from the treatment described herein. The method can be conducted wherein a HER2 receptor antagonist is administered in combination with the compound of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)) or pharmaceutically acceptable salt thereof.

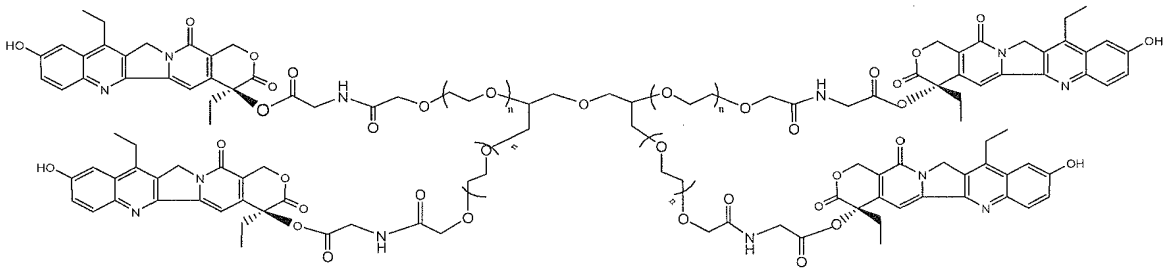
In one embodiment, a HER2 receptor antagonist can be administered with the compound of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)) concurrently or sequentially.

In another embodiment, the HER2 receptor antagonist includes anti-HER2 antibodies, antisense ErbB2 oligonucleotides, and combinations thereof.

In one preferred embodiment, the method includes the steps of:

(a) identifying a mammal having a HER2 positive cancer by e.g., determining the presence, in the mammal, of a cancer that overexpresses HER2; and

(b) administering an effective amount of a HER2 receptor antagonist, preferably trastuzumab, in combination with an effective amount of a compound of Formula (Ia):



or a pharmaceutically acceptable salt thereof to the mammal having a HER2 positive cancer,

wherein (n) is preferably about 227 so that the total molecular weight of the polymeric portion of the compound of Formula (Ia) is about 40,000 daltons.

In an alternate aspect, there are provided methods of treating a tyrosine kinase-dependent disease or disorder in a mammal. The HER2 receptor is a tyrosine kinase and it is implicated in a pathological condition such as cancer. The method includes administering a HER2 receptor antagonist in combination with a compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) to a mammal having an overexpressing HER2-dependent disease. These methods preferably include the step of identifying a patient having such a disease or disorder.

In yet another aspect, the present invention provides a method of increasing HER2 receptor antagonist effects in a mammal having a HER2 positive cancer. The method includes administering a HER2 receptor antagonist in combination with an effective amount of a compound of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)).

In yet another aspect, the present invention provides a method of inhibiting the growth, proliferation, or metastasis of HER2 positive cells in a mammal by administering a HER2 receptor antagonist in combination with the compound of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)) described herein or pharmaceutically acceptable salt thereof to a mammal or by contacting a HER2 receptor antagonist in combination with the compound of Formula (I) (alternatively, compounds of Formula (II) or (III)) described herein or pharmaceutically acceptable salt thereof with cancer cells or tissues. In one particular embodiment, the method includes:

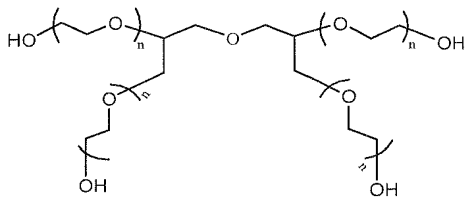
(a) determining the presence of a HER2 expression in cells; and

(b) administering a HER2 receptor antagonist and an effective amount of a compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) of claim 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a mammal in need thereof. In certain aspects, the cells are cancerous cells.

B. POLYMERIC COMPOUNDS

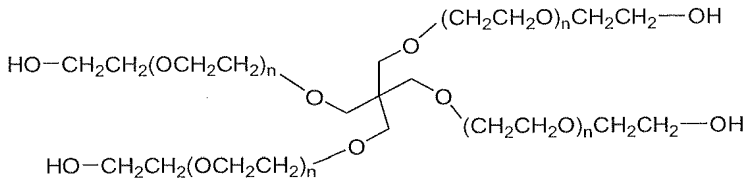
1. MULTI-ARM POLYMERS

The polymeric portion of the compounds described herein includes multi-armed PEG's attached to 20-OH group of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. In one aspect of the present invention, the polymeric prodrugs of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin include four-arm PEG, prior to conjugation, having the following structure of



wherein (n) is a positive integer.

Alternatively, the polymeric compounds employ four-arm PEG, prior to conjugation, having the structure:



The multi-armed PEG's are those described in NOF Corp. Drug Delivery System catalog, Ver. 8, April 2006, the disclosure of which is incorporated herein by reference.

In one preferred embodiment of the invention, the degree of polymerization for the polymer (n) is from about 28 to about 341 to provide polymers having the total number average molecular weight of from about 5,000 Da to about 60,000 Da, and preferably from about 114 to about 239 to provide polymers having the total number average molecular weight of from about 20,000 Da to about 42,000 Da. (n) represents the number of repeating units in the polymer chain and is dependent on the molecular weight of the polymer. In one particularly preferred embodiment of the invention, (n) is about 227 to provide the polymeric portion having the total number average molecular weight of about 40,000 Da.

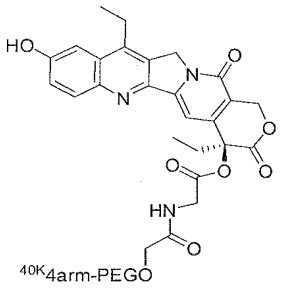
2. BIFUNCTIONAL LINKERS

In certain preferred aspects of the present invention, bifunctional linkers include an amino acid. The amino acid which can be selected from any of the known naturally-occurring L-amino acids is, e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, glycine, serine, threonine, methionine, cysteine, phenylalanine, tyrosine, tryptophan, aspartic acid, glutamic acid, lysine, arginine, histidine, proline, and/or a combination thereof, to name but a few. In alternative aspects, L can be a peptide residue. The peptide can range in size, for instance, from about 2 to about 10 amino acid residues (e.g., 2, 3, 4, 5, or 6).

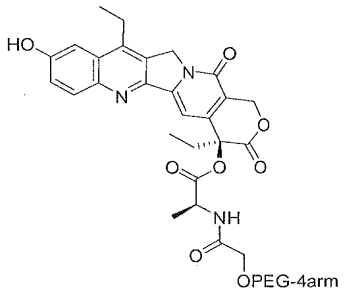
Derivatives and analogs of the naturally occurring amino acids, as well as various art-known non-naturally occurring amino acids (D or L), hydrophobic or non-hydrophobic, are also contemplated to be within the scope of the invention. Simply by way of example, amino acid analogs and derivates include:

2-aminoadipic acid, 3-aminoadipic acid, beta-alanine, beta-aminopropionic acid, 2-aminobutyric acid, 4-aminobutyric acid, piperidinic acid, 6-aminocaproic acid, 2-aminoheptanoic acid, 2-aminoisobutyric acid, 3-aminoisobutyric acid,

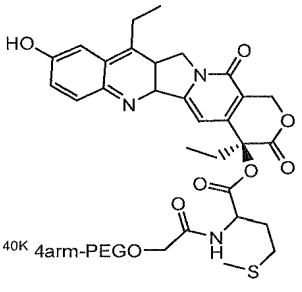
2-aminopimelic acid, 2,4-aminobutyric acid, desmosine, 2,2-diaminopimelic acid, 2,3-diaminopropionic acid, N-ethylglycine, N-ethylasparagine, 3-hydroxyproline, 4-hydroxyproline, isodesmosine, allo-isoleucine, N-methylglycine or sarcosine, N-methylisoleucine, 6-N-methyllysine, N-methylvaline, norvaline, norleucine, ornithine, and others too numerous to mention, that are listed in 63 Fed. Reg., 29620, 29622, incorporated by reference herein. Some preferred L groups include glycine, alanine, methionine or sarcosine. For example, the compounds can be among:



(Compound **9**: glycine),

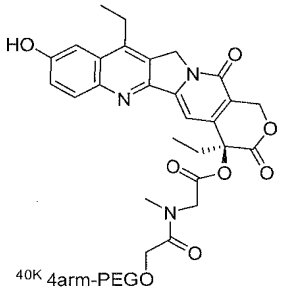


(compound **12**: alanine)



, and

(Compound **18**: methionine),



(compound **23**: sarcosine).

For ease of the description and not limitation, only one arm of the four-arm PEG is shown. One arm, up to four arms of the four-arm PEG can be conjugated with 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin.

More preferably, the treatment described herein employs compounds including a glycine as the linker group (L).

In an alternative aspect of the present invention, L after attachment between the polymer and 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin can be selected among:

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23})_t-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23})_t-O-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23})_t-NR_{26}-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_t-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_tO-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_tNR_{26}-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_t-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_tO-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_tNR_{26}-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23}O)_t-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}O)_t-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23}O)_t-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23}O)_t(CR_{24}R_{25})_y-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}O)_t(CR_{24}R_{25})_y-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23}O)_t(CR_{24}R_{25})_y-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23}O)_t(CR_{24}R_{25})_yO-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}R_{25}O)_y-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}O)_t(CR_{24}R_{25})_yO-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}R_{25}O)_y-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23}O)_t(CR_{24}R_{25})_yO-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}R_{25}O)_y-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23})_tO-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23})_tNR_{26}-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23})_tS-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_tO-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_tNR_{26}-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_tS-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_tO-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_tNR_{26}-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_tS-(CR_{28}R_{29})_{t'}-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_tNR_{26}-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_tNR_{26}-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_tNR_{26}-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-$,

$-[C(=O)]_v(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t(CR_{24}R_{25})_y-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t(CR_{24}R_{25})_y-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t(CR_{24}R_{25})_y-$,

$-[C(=O)]_v\ (CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t(CR_{24}R_{25})_yO-$,

$-[C(=O)]_v\ (CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_y-$,

$-[C(=O)]_v\ (CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_yNR_{26}-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t(CR_{24}R_{25})_yO-$,

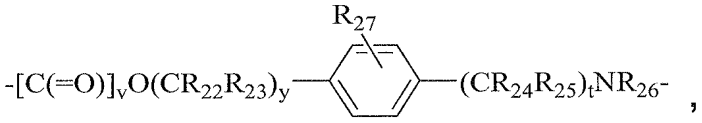
$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_y-$,

$-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}CR_{25}CR_{28}R_{29}O)_yNR_{26}-$,

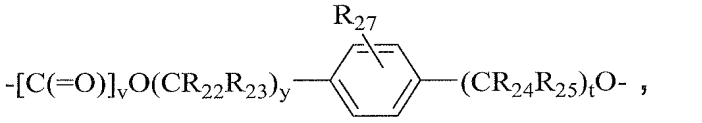
$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t(CR_{24}R_{25})_yO-$,

$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_y-$,

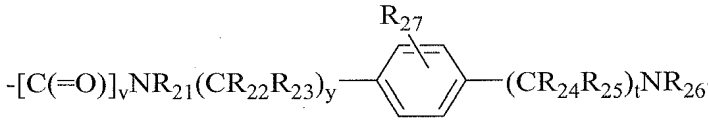
$-[C(=O)]_vNR_{21}(CR_{22}R_{23})_t(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_yNR_{26}-$,



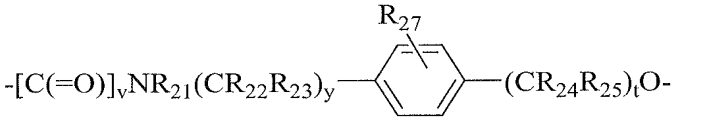
,



,



, and



wherein:

R_{21}-R_{29} are independently selected among hydrogen, amino, substituted amino, azido, carboxy, cyano, halo, hydroxyl, nitro, silyl ether, sulfonyl, mercapto, C_{1-6} alkylmercapto, arylmercapto, substituted arylmercapto, substituted C_{1-6} alkylthio, C_{1-6} alkyls, C_{2-6} alkenyl, C_{2-6} alkynyl, C_{3-19} branched alkyl, C_{3-8} cycloalkyl, C_{1-6} substituted alkyl, C_{2-6} substituted alkenyl, C_{2-6} substituted alkynyl, C_{3-8} substituted cycloalkyl, aryl, substituted aryl, heteroaryl, substituted heteroaryl, C_{1-6} heteroalkyl, substituted C_{1-6} heteroalkyl, C_{1-6} alkoxy, aryloxy, C_{1-6} heteroalkoxy, heteroaryloxy, C_{2-6} alkanoyl, arylcarbonyl, C_{2-6} alkoxycarbonyl, aryloxycarbonyl, C_{2-6} alkanoyloxy, arylcarbonyloxy, C_{2-6} substituted alkanoyl, substituted arylcarbonyl, C_{2-6} substituted alkanoyloxy, substituted aryloxycarbonyl, C_{2-6} substituted alkanoyloxy, substituted and arylcarbonyloxy;

(t), (t') and (y) are independently chosen from zero or a positive integer, preferably from about 1 to about 10 such as 1, 2, 3, 4, 5 and 6; and

(v) is 0 or 1.

The bifunctional linkers contemplated within the scope of the present invention include those in which combinations of substituents and variables are permissible so that such combinations result in stable compounds.

In some preferred embodiments, L can include:

$-[C(=O)]_v(CH_2)_t-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2)_t-O-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2)_t-NH-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2)_t-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2)_tO-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2)_tNH-$,

$-[C(=O)]_vNH(CH_2)_t-$,

$-[C(=O)]_vNH(CH_2)_tO-$,

$-[C(=O)]_vNH(CH_2)_tNH-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2O)_t-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2O)_t-$,

$-[C(=O)]_vNH(CH_2O)_t-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2O)_t(CH_2)_y-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2O)_t(CH_2)_y-$,

$-[C(=O)]_vNH(CH_2O)_t(CH_2)_y-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2O)_t(CH_2)_yO-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2)_t(CH_2O)_y-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2O)_t(CH_2)_yO-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2)_t(CH_2O)_y-$,

$-[C(=O)]_vNH(CH_2O)_t(CH_2)_yO-$,

$-[C(=O)]_vNH(CH_2)_t(CH_2O)_y-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2)_tO-(CH_2)_{t'}-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2)_tNH-(CH_2)_{t'}-$,

$-[C(=O)]_v(CH_2)_tS-(CH_2)_{t'}-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2)_tO-(CH_2)_{t'}-$,

$-[C(=O)]_vO(CH_2)_tNH-(CH_2)_{t'}-$,

-[C(=O)]$_v$O(CH$_2$)$_t$S-(CH$_2$)$_{t'}$- ,

-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$)$_t$O-(CH$_2$)$_{t'}$- ,

-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$)$_t$NH-(CH$_2$)$_{t'}$- ,

-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$)$_t$S-(CH$_2$)$_{t'}$- ,

-[C(=O)]$_v$(CH$_2$CH$_2$O)$_t$NH- ,

-[C(=O)]$_v$(CH$_2$CH$_2$O)$_t$- ,

-[C(=O)]$_v$O(CH$_2$CH$_2$O)$_t$NH- ,

-[C(=O)]$_v$O(CH$_2$CH$_2$O)$_t$- ,

-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$CH$_2$O)$_t$NH- ,

-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$CH$_2$O)$_t$- ,

-[C(=O)]$_v$(CH$_2$CH$_2$O)$_t$(CH$_2$)$_y$- ,

-[C(=O)]$_v$O(CH$_2$CH$_2$O)$_t$(CH$_2$)$_y$- ,

-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$CH$_2$O)$_t$(CH$_2$)$_y$- ,

-[C(=O)]$_v$(CH$_2$CH$_2$O)$_t$(CH$_2$)$_y$O- ,

-[C(=O)]$_v$ (CH$_2$)$_t$(CH$_2$CH$_2$O)$_y$- ,

-[C(=O)]$_v$ (CH$_2$)$_t$(CH$_2$CH$_2$O)$_y$NH- ,

-[C(=O)]$_v$O(CH$_2$CH$_2$O)$_t$(CH$_2$)$_y$O- ,

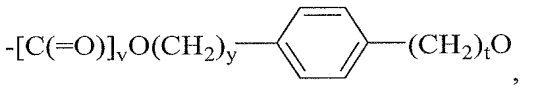
-[C(=O)]$_v$O(CH$_2$)$_t$(CH$_2$CH$_2$O)$_y$- ,

-[C(=O)]$_v$O(CH$_2$)$_t$(CH$_2$CH$_2$O)$_y$NH- ,

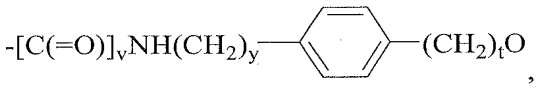
-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$CH$_2$O)$_t$(CH$_2$)$_y$O- ,

-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$)$_t$(CH$_2$CH$_2$O)$_y$- ,

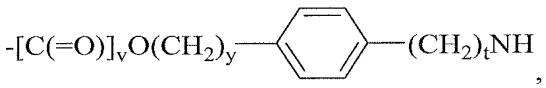
-[C(=O)]$_v$NH(CH$_2$)$_t$(CH$_2$CH$_2$O)$_y$NH- ,



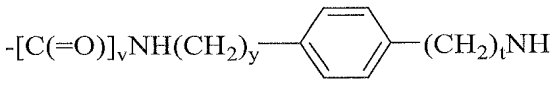
,



,



, and



wherein (t), (t') and (y) are independently chosen from zero or a positive integer, preferably from about 1 to about 10 (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, and 6); and

(v) is 0 or 1.

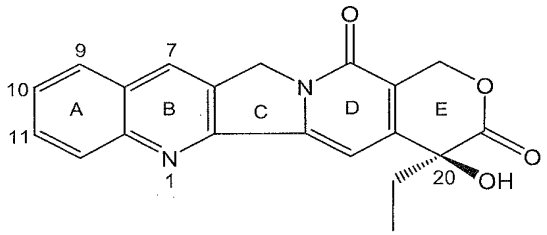
In some aspects of the present invention, the compounds of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) include from 1 to about 10 units (e.g., 1, 2, 3, 4, 5, or 6) of the bifunctional linker. In some preferred aspects of the present invention, the compounds include one unit of the bifunctional linker and thus (m) is 1.

Additional linkers are found in Table 1 of Greenwald et al. (*Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1998, 6:551-562), the contents of which are incorporated by reference herein.

3. CAMPTOTHECIN AND RELATED CAMPTOTHECIN ANALOGS

Camptothecin is a water-insoluble cytotoxic alkaloid produced by *camptoteca accuminata* trees indigenous to China and *nothapodytes foetida* trees indigenous to India. Camptothecin and related compounds and analogs are also known to be potential anticancer or antitumor agents and have been shown to exhibit these activities *in vitro* and *in vivo* in laboratory animals. For example, camptothecin analogs useful in the treatment described herein includes SN38, camptothecin, topotecan, and CPT-11.

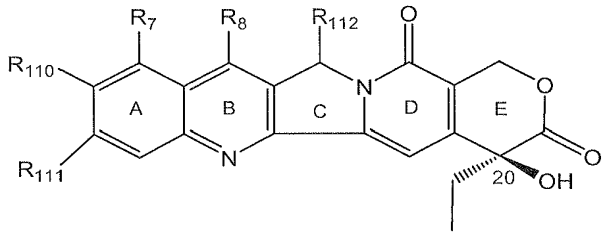
Camptothecin and certain related analogues share the structure:



From this core structure, several known analogs have been prepared. For example, the A ring in either or both of the 10- and 11-positions can be substituted with an OH. The A ring can also be substituted with a straight or branched C_{1-30} alkyl or C_{1-17} alkoxy, optionally linked to the ring by a heteroatom i.e.- O or -S. The B ring can be substituted in the 7-position with a straight or branched C_{1-30} alkyl (preferably C_2 alkyl), C_{5-8} cycloakyl, C_{1-30} alkoxy, phenyl alkyl, etc., alkyl carbamate, alkyl carbazides, phenyl hydrazine derivatives, etc. Other substitutions are possible in the C, D and E rings. See, for example, U.S. Patent Nos. 5,004,758; 4,943,579; RE 32,518, the contents of which are incorporated herein by reference. As the artisan will appreciate, the 10-hydroxycamptothecin, 11-hydroxycamptothecin and the 10,11-dihydroxycamtothecin analogs occur naturally as one of the minor components in *C. Acuminata* and its relatives. Additional substitutions to these compounds, i.e. 7-alkyl-, 7-substituted alkyl-, 7-amino-, 7-aminoalkyl-, 7-aralkyl-, 9-alkyl-, 9-aralkyl- camptothecin etc.

derviatives can be made using known synthetic techniques without undue experimentation. Some camptotheca alkaloids have the structure shown below:

(IV)



wherein

R_7 is selected among NO_2, NH_2, N_3, hydrogen, halogen, F, Cl, Br, I, COOH, OH, O-C_{1-8} alkyl, SH, S-C_{1-3} alkyl, CN, CH_2NH_2, NH-C_{1-3} alkyl, CH_2-NH-C_{1-3} alkyl, N(C_{1-3} alkyl)$_2$, $CH_2N(C_{1-3}$ alkyl)$_2$, O-, NH- and S-$CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$, O-, NH- and S-$CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$, O-, NH- and S-$CH_2CH_2N(CH_2CH_2CH_2OH)_2$, O-, NH- and S-$CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2CH_2OH)_2$, O-, NH- and S-$CH_2CH_2N(C_{1-3}$ alkyl)$_2$, O-, NH- and S-$CH_2CH_2CH_2N(C_{1-3}$ alkyl)$_2$, CHO and C_{1-3} alkyl;

R_8 is selected among hydrogen, C_{1-8} alkyl and $CH_2NR_9R_{10}$,

wherein

R_9 is selected from the group consisting of hydrogen, C_{1-6} alkyl, C_{3-7} cycloalkyl, C_{3-7} cycloalkyl-C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, hydroxy-C_{1-6} alkyl, and C_{1-6} alkoxy-C_{1-6} alkyl; and

R_{10} is selected among hydrogen, C_{1-6} alkyl, C_{3-7} cycloalkyl, C_{3-7} cycloalkyl-C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, hydroxy-C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy-C_{1-6} alkyl, and COR_{11}, wherein R_{11} is selected from the group consisting of hydrogen, C_{1-6} alkyl, perhalo-C_{1-6} alkyl, C_{3-7} cycloalkyl, C_{3-7} cycloalkyl-C_{1-6} alkyl, C_{2-6} alkenyl, hydroxy-C_{1-6} alkyl, C_{1-6} alkoxy, and C_{1-6} alkoxy-C_{1-6} alkyl;

R_{110}-R_{111} are each independently selected among hydrogen, halo, acyl, alkyl, substituted alkyl, alkoxy, substituted alkoxy, alkenyl, alkynyl, cycloalkyl, hydroxy, cyano, nitro, azido, amido, hydrazine, amino, substituted amino, hydroxcarbonyl, alkoxycarbonyl, alkylcarbonyloxy, alkylcarbonylamino, carbamoyloxy, arylsulfonyloxy, alkylsulfonyloxy, -$C(R_{117})$=N-$(O)_j$-R_{118} wherein R_{117} is H, alkyl, alkenyl, cycloalkyl, or aryl, (j) is 0 or 1, and R_{118} is H, alkyl, alkenyl, cycloalkyl, or heterocycloalkyl, and $R_{119}C(O)O$- wherein R_{119} is halogen, amino, substituted amino, heterocycloalkyl, substituted heterocycloalkyl, or R_{120}-O-

$(CH_2)_k$- where (k) is an integer of 1-10 and R_{120} is alkyl, phenyl, substituted phenyl, cycloalkyl, substituted cycloalkyl, heterocycloalkyl, or substituted heterocycloalkyl; or

R_7 together with R_{110}, or R_{110} together with R_{111}, form substituted or unsubstituted methylenedioxy, ethylenedioxy, or ethyleneoxy; and

R_{112} is H or OR', wherein R' is alkyl, alkenyl, cycloalkyl, haloalkyl, or hydroxyalkyl.

Preferred aryl groups are phenyl and naphthyl. Preferred heterocycloalkyl rings include bipiperidine. Suitable heterocyclic rings when R_9 and R_{10} are taken together with the nitrogen atom to which they are attached include: aziridine, azetidine, pyrrolidine, piperidine, hexamethylenimine, imidazolidine, pyrazolidine, isoxazolidine, piperazine, N-methylpiperazine, tetrahydroazepine, N-methyl-tetrahydroazepine, thiazolidine, etc.

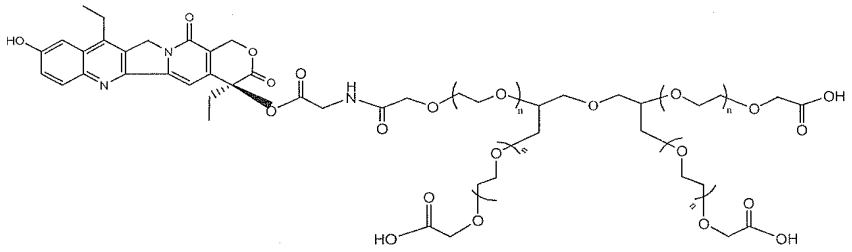
For ease of description and not limitation, the description refers to 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, or CPT-11 as the camptothecin analog, as the preferred and illustrated compound. It will be understood that the claimed invention includes all such derivatives and analogs so long as the analog has an OH, such as the 20-OH group, for the point of attachment to the polymer. The camptothecin or camptothecin analogs can be racemic mixtures or optically pure isomer. Preferably, a substantially pure and active form of such as the 20(S) camptothecin or camptothecin analog is employed in the multi-arm polymeric prodrugs.

4. SYNTHESIS OF POLYMERIC COMPOUNDS

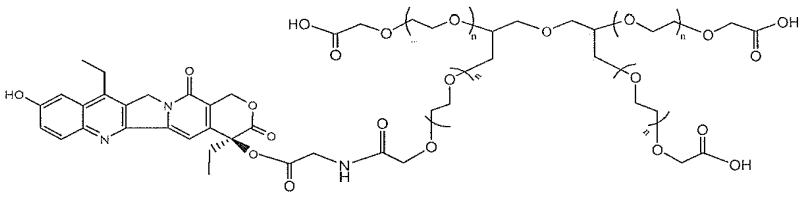
Generally, the polymeric compounds employed in the treatment described herein are prepared by reacting one or more equivalents of an activated multi-arm polymer with, for example, one or more equivalents per active site of amino acid-(20)-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin under conditions which are sufficient to effectively cause the amino group to undergo a reaction with the carboxylic acid of the polymer and form a linkage. Details of the synthesis are described in U.S. Patent No. 7,462,627, the contents of which are incorporated herein by reference in its entirety.

Examples of preferred bifunctional linker groups include glycine, alanine, methionine, sarcosine, etc. and syntheses are described in the Examples of U.S. Patent No. 7,462,627.

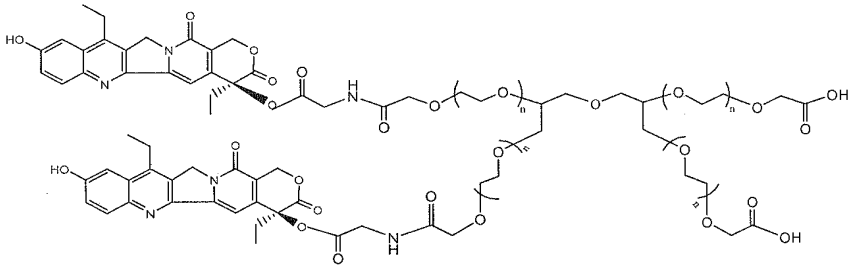
According to the present invention, the compounds administered include:



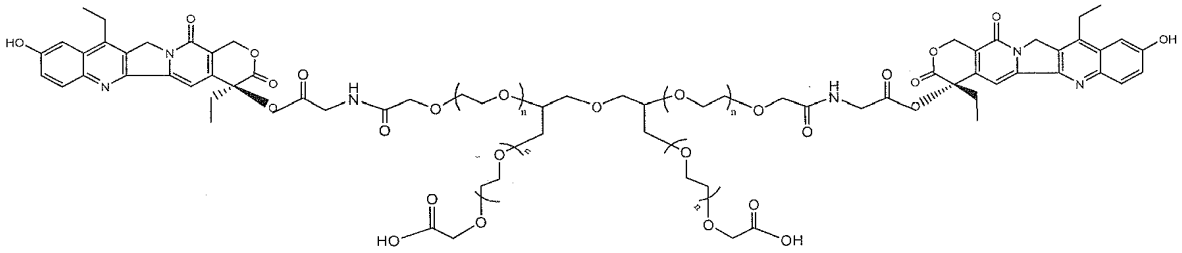
,



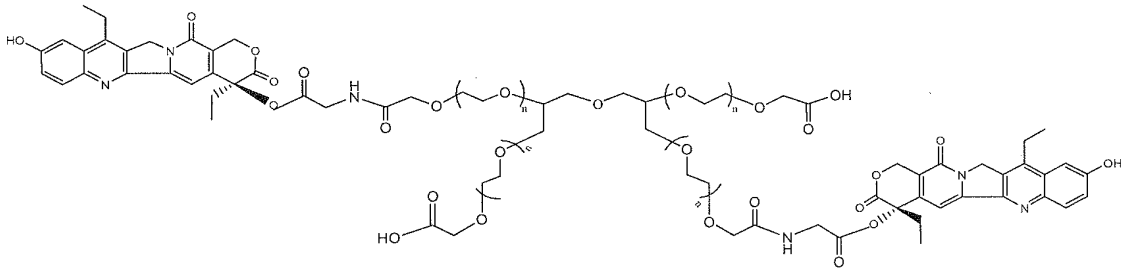
,



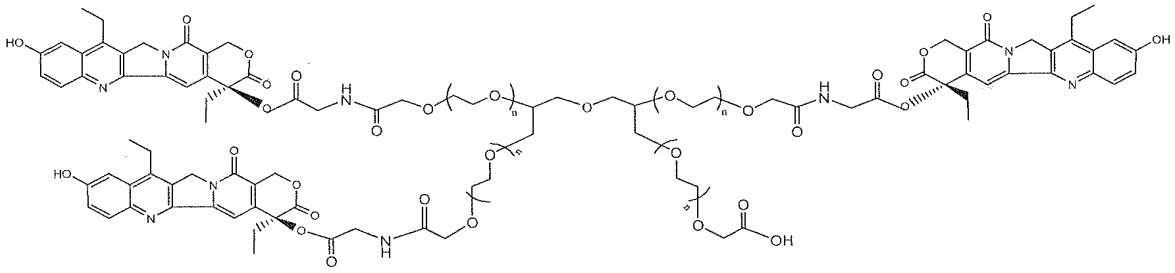
,



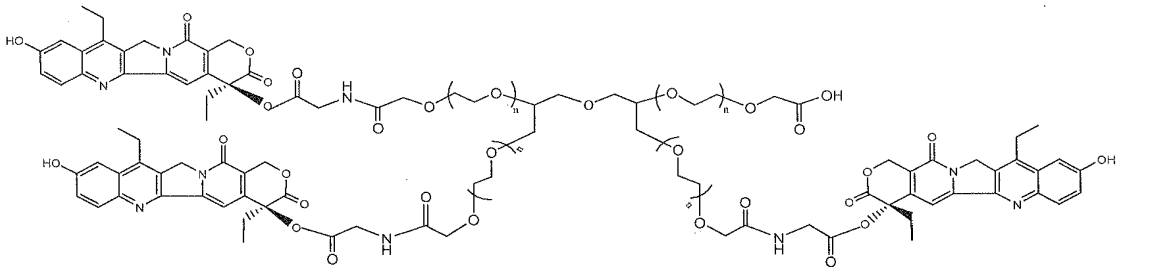
,



,

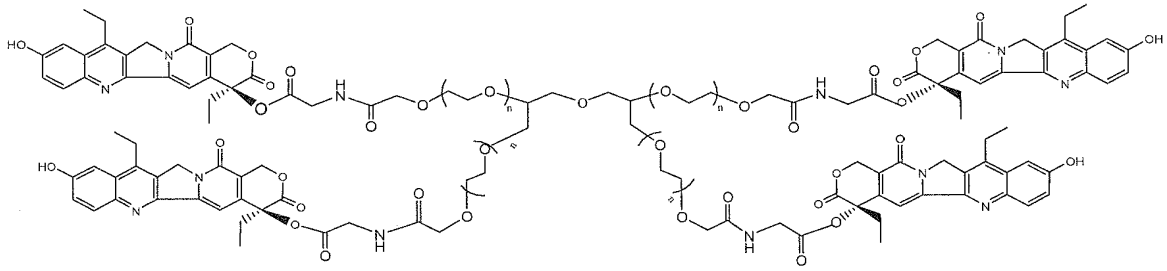


,



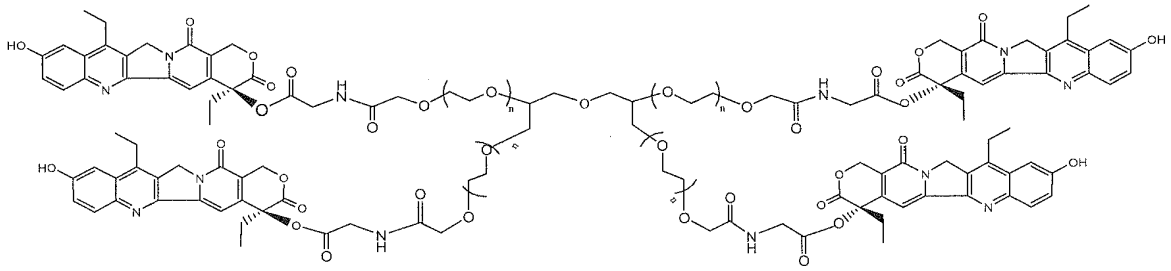
,

and



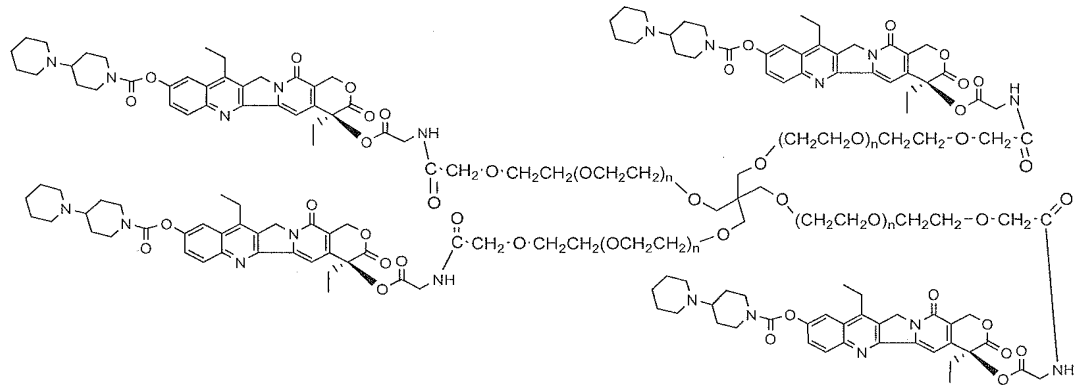
.

One particularly preferred embodiment includes administering a compound having the structure: (Ia)

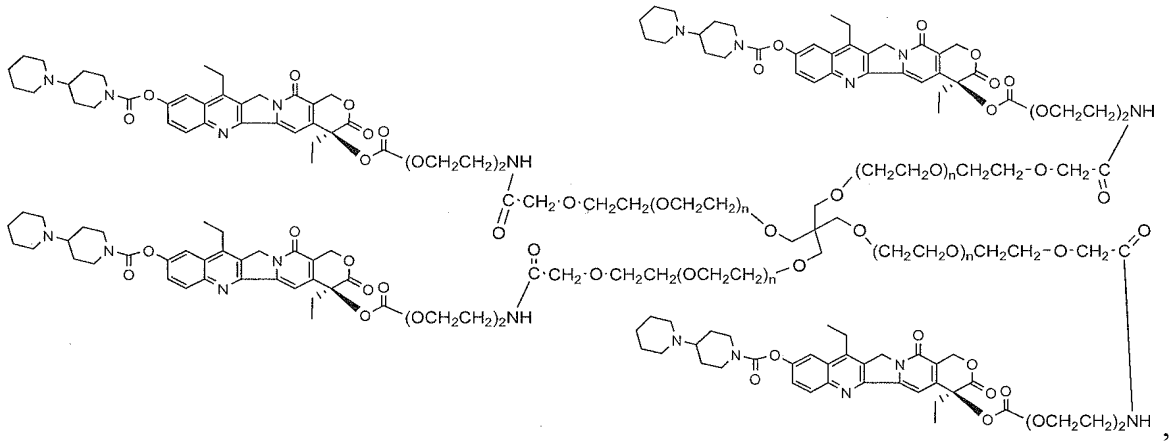


wherein all four arms of the polymer are conjugated to 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin through glycine and the polymer portion has the total number average molecular weight of about 40,000 daltons.

An alternative embodiment useful in the treatment described herein includes



or



wherein (n) is an integer of from about 28 to about 341, so that the total molecular weight of the polymeric portion of the compound of Formula (II) ranges from about 5,000 to about 60,000 daltons, preferably about 20,000 or 40,000 daltons.

In a further embodiment, the treatment described herein employs polymeric compounds described in WO2005/028539, the contents of which are incorporated herein by reference in its entirety.

C. HER2 ANTAGONISTS

Many types of cancers have been associated with increased levels of the HER2 protein and gene. The HER2 protein catalyzes the transfer of the terminal phosphate from ATP to tyrosine residues of protein substrates. The HER2 receptor antagonist and HER2 antagonist generally refer to compounds which inhibit function or expression of the HER2 protein or gene. HER2 receptor antagonists can inhibit HER2 receptor function directly or via downstream or upstream cellular signaling pathway in which the HER2 protein is involved. In particular, HER2 receptor antagonists used in the combination treatment

described herein includes anti-HER2 antibodies and antisense HER2 oligonucleotides which directly inhibit HER2 receptor function or expression of HER2 receptor, instead of inhibiting the HER2 receptor function via downstream or upstream signaling pathway.

In one embodiment, the combination treatment described herein is conducted by administering an anti-HER2 receptor antibody in combination with a compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)). The antibody binds to the HER2 receptor protein (p185). Preferably, the antibody useful in the treatment described herein binds to the extracellular domain of the HER2 receptor such as HER2 domain II and/or IV. One particular embodiment employs trastuzumab. Another particular embodiment employs pertuzumab.

Trastuzumab under the tradename Herceptin® is a recombinant humanized monoclonal antibody directed against the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). After binding to HER2 receptor on the tumor cell surface, trastuzumab induces an antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity against tumor cells that overexpress HER2 receptor. HER2 is overexpressed by many adenocarcinomas, particularly breast adenocarcinomas. Trastuzumab is registered in CAS Registry No. 180288-69-1. Detailed information about trastuzumab is described in U.S. Patent No. 6,165,464, the contents of which are incorporated herein by reference.

Pertuzumab under the tradename Omnitarg™ is also a recombinant humanized monoclonal antibody (2C4) directed against the extracellular dimerization domain of the HER2 receptor. (CAS Registry No. 380610-27-5). Pertuzumab binds to the dimerization domain of the HER2 receptor and inhibits the ability of the HER2 receptor protein to dimerize with other HER tyrosine kinase receptor proteins. The inhibition of receptor protein dimerization prevents the activation of HER signaling pathways, resulting in tumor cell apoptosis. Pertuzamab, also known as rhuMAb 2C4, is described, for example in U.S. Patent Nos. 6,949,245 and 5,821,337, incorporated by reference herein.

In another embodiment, the methods described herein can be conducted wherein the compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) is administered with antisense HER2 (ErbB2) oligonucleotides or pharmaceutically acceptable salt thereof. The antisense HER2 oligonucleotides can be administered concurrently or sequentially.

In one embodiment, the antisense HER2 oligonucleotide includes nucleic acids complementary to at least 8 consecutive nucleotides of HER2 pre-mRNA or mRNA.

An "oligonucleotide" is generally a relatively short polynucleotide, e.g., ranging in size from about 2 to about 200 nucleotides, or preferably from about 8 to about 50

nucleotides, or more preferably from about 8 to about 30 nucleotides. The oligonucleotides according to the invention are generally synthetic nucleic acids, and are single stranded, unless otherwise specified. The terms, "polynucleotide" and "polynucleic acid" may also be used synonymously herein.

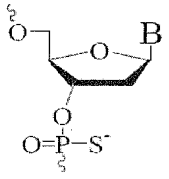
The oligonucleotides (analogs) are not limited to a single species of oligonucleotide but, instead, are designed to work with a wide variety of such moieties. The nucleic acids molecules contemplated can include a phosphorothioate internucleotide linkage modification, sugar modification, nucleic acid base modification and/or phosphate backbone modification. The oligonucleotides can contain natural phosphorodiester backbone or phosphorothioate backbone or any other modified backbone analogues such as LNA (Locked Nucleic Acid), PNA (nucleic acid with peptide backbone), CpG oligomers, and the like, such as those disclosed at Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, May 6-8, 2002, Las Vegas, NV and Oligonucleotide & Peptide Technologies, 18th & 19th November 2003, Hamburg, Germany, the contents of which are incorporated herein by reference.

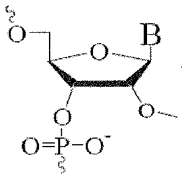
Modifications to the oligonucleotides contemplated by the invention include, for example, the addition or substitution of functional moieties that incorporate additional charge, polarizability, hydrogen bonding, electrostatic interaction, and functionality to an oligonucleotide. Such modifications include, but are not limited to, 2'-position sugar modifications, 5-position pyrimidine modifications, 8-position purine modifications, modifications at exocyclic amines, substitution of 4-thiouridine, substitution of 5-bromo or 5-iodouracil, backbone modifications, methylations, base-pairing combinations such as the isobases isocytidine and isoguanidine, and analogous combinations. Oligonucleotides contemplated within the scope of the present invention can also include 3' and/or 5' cap structure.

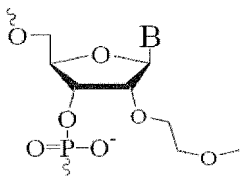
For purposes of the present invention, "cap structure" shall be understood to mean chemical modifications, which have been incorporated at either terminus of the oligonucleotide. The cap can be present at the 5'-terminus (5'-cap) or at the 3'-terminus (3'-cap) or can be present on both termini. A non-limiting example of the 5'-cap includes inverted abasic residue (moiety), 4',5'-methylene nucleotide; 1-(beta-D-erythrofuranosyl) nucleotide, 4'-thio nucleotide, carbocyclic nucleotide; 1,5-anhydrohexitol nucleotide; L-nucleotides; alpha-nucleotides; modified base nucleotide; phosphorodithioate linkage; threo-pentofuranosyl nucleotide; acyclic 3',4'-seco nucleotide; acyclic 3,4-dihydroxybutyl nucleotide; acyclic 3,5-dihydroxypentyl nucleotide, 3'-3'-inverted nucleotide moiety; 3'-3'-

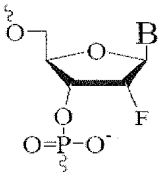
inverted abasic moiety; 3'-2'-inverted nucleotide moiety; 3'-2'-inverted abasic moiety; 1,4-butanediol phosphate; 3'-phosphoramidate; hexylphosphate; aminohexyl phosphate; 3'-phosphate; 3'-phosphorothioate; phosphorodithioate; or bridging or non-bridging methylphosphonate moiety. Details are described in WO 97/26270, incorporated by reference herein. The 3'-cap can include for example 4',5'-methylene nucleotide; 1-(beta-D-erythrofuranosyl) nucleotide; 4'-thio nucleotide, carbocyclic nucleotide; 5'-amino-alkyl phosphate; 1,3-diamino-2-propyl phosphate, 3-aminopropyl phosphate; 6-aminohexyl phosphate; 1,2-aminododecyl phosphate; hydroxypropyl phosphate; 1,5-anhydrohexitol nucleotide; L-nucleotide; alpha-nucleotide; modified base nucleotide; phosphorodithioate; threo-pentofuranosyl nucleotide; acyclic 3',4'-seco nucleotide; 3,4-dihydroxybutyl nucleotide; 3,5-dihydroxypentyl nucleotide, 5'-5'-inverted nucleotide moiety; 5'-5'-inverted abasic moiety; 5'-phosphoramidate; 5'-phosphorothioate; 1,4-butanediol phosphate; 5'-amino; bridging and/or non-bridging 5'-phosphoramidate, phosphorothioate and/or phosphorodithioate, bridging or non bridging methylphosphonate and 5'-mercapto moieties. See also Beaucage and Iyer, 1993, *Tetrahedron* 49, 1925; the contents of which are incorporated by reference herein.

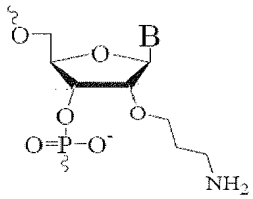
A non-limiting list of nucleoside analogs have the structure:

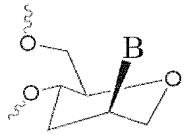

Phosphorthioate

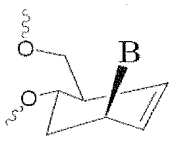

2'-O-Methyl

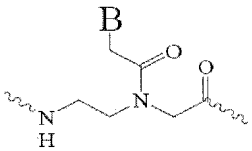

2'-MOE

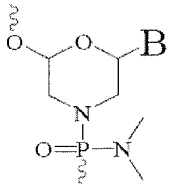

2'-Fluoro

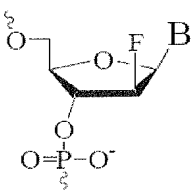

2'-AP

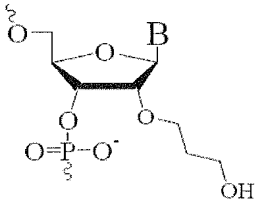

HNA

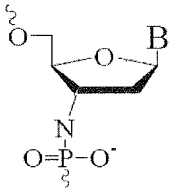

CeNA

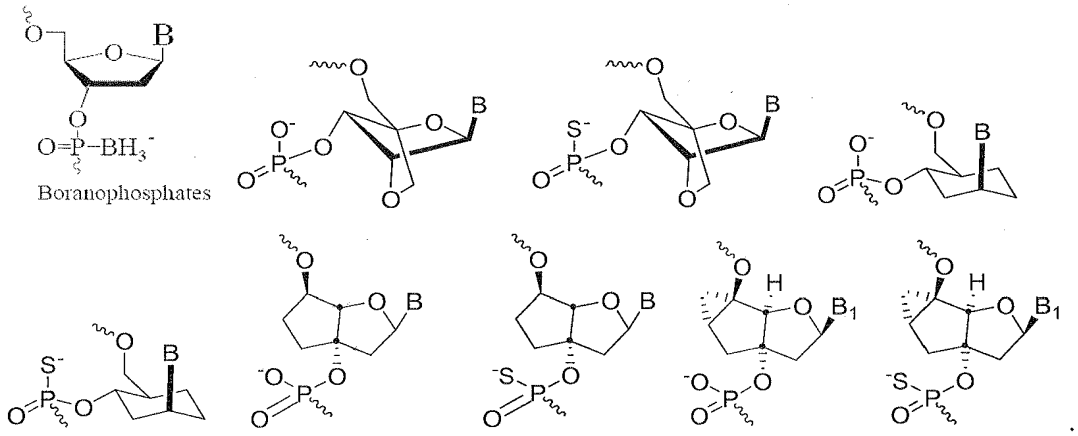

PNA


Morpholino


2'-F-ANA


2'-(3-hydroxy)propyl


3'-Phosphoramidate



See more examples of nucleoside analogues described in Freier & Altmann; *Nucl. Acid Res.*, 1997, 25, 4429-4443 and Uhlmann; *Curr. Opinion in Drug Development*, 2000, 3(2), 293-213, the contents of each of which are incorporated herein by reference.

The term "antisense," as used herein, refers to nucleotide sequences which are complementary to a specific DNA or RNA sequence that encodes a gene product or that encodes a control sequence. The term "antisense strand" is used in reference to a nucleic acid strand that is complementary to the "sense" strand. In the normal operation of cellular metabolism, the sense strand of a DNA molecule is the strand that encodes polypeptides and/or other gene products. The antisense strand serves as a template for synthesis of a messenger RNA ("mRNA") transcript (a sense strand) which, in turn, directs synthesis of any encoded gene product. Antisense nucleic acid molecules may be produced by any art-known methods, including synthesis by ligating the gene(s) of interest in a reverse orientation to a viral promoter which permits the synthesis of a complementary strand. Once introduced into a cell, this transcribed strand combines with natural sequences produced by the cell to form duplexes. These duplexes then block either the further transcription or translation. The designations "negative" or (-) are also art-known to refer to the antisense strand, and "positive" or (+) are also art-known to refer to the sense strand.

For purposes of the present invention, "complementary" shall be understood to mean that a nucleic acid sequence forms hydrogen bond(s) with another nucleic acid sequence. A percent complementarity indicates the percentage of contiguous residues in a nucleic acid molecule which can form hydrogen bonds, i.e., Watson-Crick base pairing, with a second nucleic acid sequence, i.e., 5, 6, 7, 8, 9, 10 out of 10 being 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, and 100% complementary. "Perfectly complementary" means that all the contiguous residues of

a nucleic acid sequence form hydrogen bonds with the same number of contiguous residues in a second nucleic acid sequence.

The oligonucleotides or oligonucloetide derivatives useful in the method described herein can include from about 10 to about 1000 nucleic acids, and preferably relatively short polynucleotides, *e.g.*, ranging in size from about 8 to about 30 nucleotides in length (e.g., about 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, or 30).

In one aspect of useful nucleic acids used in the method described herein, oligonucleotides and oligodeoxynucleotides with natural phosphorodiester backbone or phosphorothioate backbone or any other modified backbone analogues include:

LNA (Locked Nucleic Acid);

PNA (nucleic acid with peptide backbone);

short interfering RNA (siRNA);

microRNA (miRNA);

nucleic acid with peptide backbone (PNA);

phosphorodiamidate morpholino oligonucleotides (PMO);

tricyclo-DNA;

decoy ODN (double stranded oligonucleotide);

catalytic RNA sequence (RNAi);

ribozymes;

aptamers;

spiegelmers (L-conformational oligonucleotides);

CpG oligomers, and the like, such as those disclosed at:

Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, May 6-8, 2002, Las Vegas, NV and Oligonucleotide & Peptide Technologies, 18th & 19th November 2003, Hamburg, Germany, the contents of which are incorporated herein by reference.

In another aspect of the nucleic acids used in the method described herein, oligonucleotides can optionally include any suitable art-known nucleotide analogs and derivatives, including those listed by Table 1, below:

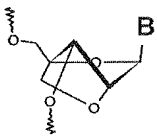
TABLE 1. Representative Nucleotide Analogs And Derivatives

4-acetylcytidine	5-methoxyaminomethyl-2-thiouridine
5-(carboxyhydroxymethyl)uridine	beta, D-mannosylqueuosine
2'-O-methylcytidine	5-methoxycarbonylmethyl-2-thiouridine
5-methoxycarbonylmethyluridine	5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine
5-methoxyuridine	5-carboxymethylaminomethyluridine

Dihydrouridine	2-methylthio-N6-isopentenyladenosine
2'-O-methylpseudouridine	N-[(9-beta-D-ribofuranosyl-2-methylthiopurine-6-yl)carbamoyl]threonine
D-galactosylqueuosine	N-[(9-beta-D-ribofuranosylpurine-6-yl)N-methylcarbamoyl]threonine
2'-O-methylguanosine	uridine-5-oxyacetic acid-methylester
2'-halo-adenosine	2'-halo-cytidine
2'-halo-guanosine	2'-halo-thymine
2'-halo-uridine	2'-halo-methylcytidine
2'-amino-adenosine	2'-amino-cytidine
2'-amino-guanosine	2'-amino-thymine
2'-amino-uridine	2'-amino-methylcytidine
Inosine	uridine-5-oxyacetic acid
N6-isopentenyladenosine	Wybutoxosine
1-methyladenosine	Pseudouridine
1-methylpseudouridine	Queuosine
1-methylguanosine	2-thiocytidine
1-methylinosine	5-methyl-2-thiouridine
2,2-dimethylguanosine	2-thiouridine
2-methyladenosine	4-thiouridine
2-methylguanosine	5-methyluridine
3-methylcytidine	N-[(9-beta-D-ribofuranosylpurine-6-yl)-carbamoyl]threonine
5-methylcytidine	2'-O-methyl-5-methyluridine
N6-methyladenosine	2'-O-methyluridine
7-methylguanosine	Wybutosine
5-methylaminomethyluridine	3-(3-amino-3-carboxy-propyl)uridine
Locked-adenosine	Locked-cytidine
Locked-guanosine	Locked-thymine
Locked-uridine	Locked-methylcytidine

In one particular embodiment, the antisense HER2 (ErbB2) oligonucleotide includes nucleotides that are complementary to at least 8 consecutive nucleotides of the sequence set forth in SEQ ID NO: 1 (GenBank Accession No. X03363). *See also*, Yamamoto, T. et al. Nature 319:230-234, 1986; *Papewalis, J.* et al. Nucleic Acids Res. 1:5452, 1991, the contents of each of which are incorporated herein by reference in its entirety.

Preferably, the oligonucleotides according to the invention described herein include one or more phosphorothioate internucleotide linkages (backbone) and one or more locked nucleic acids (LNA). Preferably, LNA monomers include 2'-O, 4'-C methylene bicyclonucleotide as shown below:



LNA Monomer
β-D configuration

D. SELECTION OF PATIENTS WITH HER2 POSITIVE CANCER

The treatment described herein benefits patients having a HER2 positive cancer. The treatment described herein significantly extends survival. Selection of patients having a HER2 positive cancer to receive the treatment described herein is predetermined by measuring levels of HER2 expression. In addition to HER2 expression levels, the patient's clinical history should be considered in selecting patients for the treatment described herein.

HER2 protein or gene levels can be measured by techniques known in the art, including, but not limited to, immunohistochemistry (IHC), silver *in situ* hybridization (SISH), chromogenic *in situ* hybridization (CISH), fluorescence *in situ* hybridization (FISH), virtual karyotyping, PCR-based methods, and other methods known in the art. Each type of assays has strength and limitations. Thus, selection of patients with a HER2 positive cancer can be more reliable when confirmed by a combination of the assays, rather than relying on a single assay to rule out potential benefit of the treatment described herein. Currently, the recommended assays are a combination of IHC and FISH.

Generally speaking, HER2 expression in cells or tissues can be assessed by measuring levels of HER2 receptor protein expression or HER2 gene amplification. FDA has approved several HER2 tests which aid to determine HER2 expression and there are several tests commercially available. These assays utilize IHC and/or FISH assays. For example, the commercially available assays include Dako HercepTest™ (Carpinteria, CA, USA) and Ventana Pathway® HER-2/neu (AZ, USA), which measure the level of HER2 protein (IHC assays); and PathVysion® and HER2 FISH pharmDx™, which measure the level of gene amplication (FISH assays). Detailed information and guidelines for assessing HER2 expression in a test specimen are provided in the package insert of each of the test kits, the contents of the package insert of each of the aforementioned test kits are incorporated herein by reference. The assessment and validation of HER2 expression measurement should follow guidelines found in the package insert of the test kits.

Both HercepTest™ and Pathway™ test kits utilize IHC and measure levels of HER2 protein in a test tissue/cell. These are highly standardized, semi-quantitative assays.

Interpretation of IHC test results use scoring system on a scale of 0 to 3+: 0 (negative), 1+ (negative), 2+ (borderline/weak positive), or 3+ (positive), based on the reviewer's interpretation of staining intensity and completeness of cell membrane staining. Score 0 indicates that there are <20,000 receptors per cell, and that there is no visible membrane staining or membrane staining is observed in less than 10 % of the tumor cells. Score 1+ indicates there are ~100,000 receptors per cell, that a faint membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells, but the membranes are partially stained. Score 2+ indicates that there are ~500,000 receptors per cell, that a weak to moderate complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells. Score 3+ indicates that there are ~2,000,000 receptors per cell, and that a strong complete membrane staining is obtained in more than 10% of the tumor cells.

With FISH testing, tumors are interpreted as HER2 negative (FISH-) or positive (FISH+) by counting the HER2/neu gene copy number. The presence of HER2 protein overexpression and gene amplification are highly correlated. FISH analysis reveals that some patients with IHC 2+ or IHC 3+ do not have gene amplification (FISH-), suggesting that these patients may be false positives. According to PathVysion® technology, approximately 40% of IHC-positive patients (2+/ 3+) did not have gene amplification, FISH negative. Thus, it is recommended that a patient with IHC 2+ be referred to a FISH test.

The combination treatment described herein is preferably given to IHC 2+ or 3+ and/or FISH+ patients. Further, the combination treatment can be given to patients with a HER2 status comparable to IHC 2+ or 3+ and/or FISH+, when other techniques such as PCR methods are used for selection of HER2 positive patients.

E. COMPOSITIONS/FORMULATIONS

Pharmaceutical compositions containing the polymer conjugates described herein and the HER2 antagonists may be manufactured by processes well known in the art, e.g., using a variety of well-known mixing, dissolving, granulating, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping or lyophilizing processes. The compositions may be formulated in conjunction with one or more physiologically acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries which facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Proper formulation is dependent upon the route of administration chosen. Parenteral routes are preferred in many aspects of the invention.

For injection, including, without limitation, intravenous, intramusclular and subcutaneous injection, the compounds of Formula (I) (alternatively, Formula (II) or (III)) described herein may be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as physiological saline buffer or polar solvents including, without limitation, a pyrrolidone or dimethylsulfoxide.

The compounds described herein may also be formulated for parenteral administration, e.g., by bolus injection or continuous infusion. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers. Useful compositions include, without limitation, suspensions, solutions or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain adjuncts such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Pharmaceutical compositions for parenteral administration include aqueous solutions of a water soluble form, such as, without limitation, a salt (preferred) of the active compound. Additionally, suspensions of the active compounds may be prepared in a lipophilic vehicle. Suitable lipophilic vehicles include fatty oils such as sesame oil, synthetic fatty acid esters such as ethyl oleate and triglycerides, or materials such as liposomes. Aqueous injection suspensions may contain substances that increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Optionally, the suspension may also contain suitable stabilizers and/or agents that increase the solubility of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile, pyrogen-free water, before use. In one embodiment, trastuzumab can be reconstituted with bacteriostatic water for injection.

For oral administration, the compounds can be formulated by combining the active compounds with pharmaceutically acceptable carriers well-known in the art. Such carriers enable the compounds of the invention to be formulated as tablets, pills, lozenges, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, pastes, slurries, solutions, suspensions, concentrated solutions and suspensions for diluting in the drinking water of a patient, premixes for dilution in the feed of a patient, and the like, for oral ingestion by a patient. Pharmaceutical preparations for oral use can be made using a solid excipient, optionally grinding the resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding other suitable auxiliaries if desired, to obtain tablets or dragee cores. Useful excipients are, in particular, fillers such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol, cellulose preparations such as, for example, maize starch, wheat starch, rice starch and potato starch and other materials such as gelatin, gum

tragacanth, methyl cellulose, hydroxypropyl- methylcellulose, sodium carboxy-methylcellulose, and/or polyvinylpyrrolidone (PVP). If desired, disintegrating agents may be added, such as cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, or alginic acid. A salt such as sodium alginate may also be used.

For administration by inhalation, the compounds of the present invention can conveniently be delivered in the form of an aerosol spray using a pressurized pack or a nebulizer and a suitable propellant.

The compounds may also be formulated in rectal compositions such as suppositories or retention enemas, using, e.g., conventional suppository bases such as cocoa butter or other glycerides.

In addition to the formulations described previously, the compounds may also be formulated as depot preparations. Such long acting formulations may be administered by implantation (for example, subcutaneously or intramuscularly) or by intramuscular injection. A compound of this invention may be formulated for this route of administration with suitable polymeric or hydrophobic materials (for instance, in an emulsion with a pharmacologically acceptable oil), with ion exchange resins, or as a sparingly soluble derivative such as, without limitation, a sparingly soluble salt.

Other delivery systems such as liposomes and emulsions can also be used.

Additionally, the compounds may be delivered using a sustained-release system, such as semi-permeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the therapeutic agent. Various sustained-release materials have been established and are well known by those skilled in the art. Sustained-release capsules may, depending on their chemical nature, release the compounds for a few weeks up to over 100 days. Depending on the chemical nature and the biological stability of the particular compound, additional stabilization strategies may be employed.

F. DOSAGES

For any compound used in the methods of the present invention, the therapeutically effective amount can be estimated initially from *in vitro* assays. Then, the dosage can be formulated for use in animal models so as to achieve a circulating concentration range that includes the effective dosage. Such information can then be used to more accurately determine dosages useful in patients.

The amount of the composition, e.g., used as a prodrug, that is administered will depend upon the parent molecule included therein (in this case, 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin). Generally, the amount of prodrug used in the methods described herein is that amount which effectively achieves the desired therapeutic result in mammals. Naturally, the dosages of the various prodrug compounds can vary somewhat depending upon the parent compound, rate of *in vivo* hydrolysis, molecular weight of the polymer, etc. In addition, the dosage, of course, can vary depending upon the dosage form and route of administration.

In general, however, the polymeric ester derivatives of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin described herein can be administered in amounts ranging from about 0.3 to about 90 mg/m^2 body surface, and preferably from about 0.5 to about 50 mg/ m^2 body surface/dose, yet preferably from about 1 to about 18 mg/ m^2 body surface/dose, and even more preferably from about 1.25 mg/m^2 body surface/dose to about 16.5 mg/m^2 body surface/dose for systemic delivery. Some particular doses include one of the following: 1.25, 2.5, 5, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 and 16.5 mg/m^2/dose. One preferred dosage includes 5 mg/m^2 body surface/dose.

The compounds of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) described herein can be administered in amounts ranging from about 0.3 to about 90 mg/ m^2 body surface/week such as, for example, from about 1 to about 18 mg/ m^2 body surface/week. In particular embodiments, the dose regimens can be, for example, from about 5 to about 7 mg/m^2 body surface weekly for 3 weeks in 4-week cycles, from about1.25 to about 45 mg/m^2 one injection every 3 weeks, and/or from about 1 to about 16 mg/m^2 three injections weekly in a four week cycle.

The treatment protocol can be based, for example, on a single dose administered once every three weeks or divided into multiple doses which are given as part of a multi-week treatment protocol. Thus, the treatment regimens can include, e.g., one dose every three weeks for each treatment cycle and, alternatively one dose weekly for three weeks followed by one week off for each cycle. It is also contemplated that the treatment will be given for one or more cycles until the desired clinical result is obtained.

The range set forth above is illustrative and those skilled in the art will determine the optimal dosing of the prodrug selected based on clinical experience and the treatment indication. Moreover, the exact formulation, route of administration and dosage can be selected by the individual physician in view of the patient's condition. The precise dose will depend on the stage and severity of the condition, and the individual characteristics of the

patient being treated, as will be appreciated by one of ordinary skill in the art.

Additionally, toxicity and therapeutic efficacy of the compounds described herein can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals using methods well-known in the art.

In some preferred embodiments, the treatment protocol includes administering the amount ranging from about 1.25 to about 16.5 mg/m^2 body surface/dose weekly for three weeks, followed by one week without treatment and repeating for about 3 cycles or more until the desired results are observed. The amount administered per each cycle can range from about 2.5 to about 16.5 mg/m^2 body surface/dose.

In one particular embodiment, the polymeric ester derivatives of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin can be administered in one dose, such as 5, 9 or 10 mg/m^2 weekly for three weeks, followed by one week without treatment. The dosage of the treatment cycle can be designed as an escalating dose regimen when two or more treatment cycles are applied. The polymeric drug is preferably administered via IV infusion.

In another particular embodiment, the compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) is administered in a dose from about 12 to about 16 mg/m^2 body surface/dose. The dose can be given weekly. The treatment protocol includes administering the compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) in amounts ranging from about 12 to about 16 mg/m^2 body surface/dose weekly for three weeks, followed by one week without treatment.

In yet another particular embodiment, the dose regiment can be about 10 mg/m^2 body surface/dose every three weeks.

Alternative embodiments include: for the treatment of pediatric patients, a regimen based on a protocol of about 1.85 mg/m^2 body surface/dose daily for 5 days every three weeks, a protocol of from about 1.85 to about 7.5 mg/m^2 body surface/dose daily for 3 days every 25 days, or a protocol of about 22.5 mg/m^2 body surface/dose once every three weeks, and for the treatment of adult patients, a protocol based on about 13 mg/m^2 body surface/dose every three weeks or about 4.5 mg/m^2 body surface/dose weekly for four weeks every six weeks. The compounds described herein can be administered in combination with a second therapeutic agent. In one embodiment, the combination therapy includes a protocol of about 0.75 mg/m^2 body surface/dose daily for 5 days each cycle in combination with a second agent.

Alternatively, the compounds can be administered based on body weight. The dosage range for systemic delivery of a compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) in a mammal will be from about 1 to about 100 mg/kg/week and is preferably from about 2 to

about 60 mg/kg/week. Thus, the amounts can range from about 0.1 mg/kg body weight/dose to about 30 mg/kg body weight/dose, preferably, from about 0.3 mg/kg to about 10 mg/kg. Specific doses such as 5 or 10 mg/kg at q2d x 5 regimen (multiple dose) or 20 or 30 mg/kg on a single dose regimen can be administered.

In all aspects of the invention where polymeric conjugates are administered, the dosage amount mentioned is based on the amount of an active agent (preferably, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) rather than the amount of polymeric conjugate administered. It is contemplated that the treatment will be given for one or more cycles until the desired clinical result is obtained. The exact amount, frequency and period of administration of the compound of the present invention will vary, of course, depending upon the sex, age and medical condition of the patient as well as the severity of the disease as determined by the attending clinician. The weight given above represents the weight of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin present in the PEG-conjugated 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin employed for treatment. The actual weight of the PEG-conjugated 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin will vary depending on the loading of the PEG (e.g., optionally from one to four moles of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin per mole of PEG.).

The HER2 antagonists can be administered in combination with the compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) concurrently or sequentially. The combination therapy protocol includes administering an anti-HER2 antibody ranging from about 0.5/kg to about 15 mg/kg body weight, i.e., from about 2 mg/kg to about 8 mg/kg/dose such as 2, 4, 5, 6, 8 mg/kg/dose.

In one embodiment, trastuzumab is administered based on a protocol: initial dose at 4 mg/kg i.v. followed by 2 mg/kg/dose i.v. weekly during and after the combination therapy, or initial dose at 8 mg/kg i.v. followed by 6 mg/kg i.v. every three weeks, until a desired clinical result is achieved. Detailed dosing information of trastuzumab is described in the package insert of Herceptin®, the contents of which are incorporated herein by reference.

In another embodiment, pertuzumab is administered in an amount raging from about 0.5 to about 15 mg/kg/dose i.v. every three weeks during and after the combination treatment described herein. Pertuzumab is given based on a protocol: 5 mg/kg/dose every three weeks. See *Agus, D.B., et al.*, Journal of Clinical Oncology, 23:2534-2543, 2005, the contents of which are incorporated herein by reference.

The combination therapy protocol includes administering an antisense oligonucleotide in an amount of from about 2 to about 100 mg/kg/dose (e.g., 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30,

35, 40, 50, 60, 70, 100 mg/kg/dose). For example, the combination therapy regimen dose includes treatment with an antisense HER2 oligonucleotide in an amount of from about 2 to about 50 mg/kg/dose. Preferably, the antisense oligonucleotide administered in the combination therapy is in an amount of from about 4 to about 25 mg/kg/dose.

In one aspect of the combination therapy, the protocol includes administering an antisense HER2 oligonucleotide in an amount of about 4 to about 18 mg/kg/dose weekly, or about 4 to about 9.5 mg/kg/dose weekly during the combination therapy.

In one particular embodiment, the combination therapy protocol includes an antisense HER2 oligonucleotide in an amount of about 4 to about 18 mg/kg/dose weekly for 3 weeks in a six week cycle (i.e. about 8 mg/kg/dose). Another particular embodiment includes about 4 to about 9.5 mg/kg/dose weekly (i.e., about 4.1 mg/kg/dose).

Where the HER2 antagonists encompassed by the present invention are administered in combination with the compounds of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) described herein, the individual components of the combinations may be administered either sequentially or simultaneously in separate or combined pharmaceutical formulations by any convenient route. When the HER2 antagonist and the compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) is administered sequentially, either the compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) or the HER antagonist may be administered first. For example, the HER2 antagonist and the compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) may be administered in a sequential manner in a regimen that will provide beneficial effects of the combination. When the HER2 antagonist and the compound of Formula (I) (or Formula (II) or (III)) is administered in a simultaneous manner, the combination may be administered either in the same or different pharmaceutical compositions.

Further aspects of the present invention include combining the HER2 antagonist and the compounds described herein with other chemotherapy or radiotherapy for additive benefit.

EXAMPLES

The following examples serve to provide further appreciation of the invention but are not meant in any way to restrict the effective scope of the invention.

EXAMPLE 1. TOXICITY DATA

A maximum tolerated dose ("MTD") of 4arm-PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) (compound **9**) was studied using nude mice. Mice were monitored for

14 days for mortality and signs of illness and sacrificed when body weight loss was >20% of the pretreatment body weight.

Table 2, below, shows the maximum tolerated dose of each compound for both single dose and multiple dose administration. Each dose for multiple dose administration was given mice every other day for 10 days and the mice were observed for another 4 days, thus for total 14 days.

TABLE 2. MTD Data in Nude Mice

Compound	Dose Level (mg/kg)	Survival/Total	Comments
Compound **9** Single dose	25	5/5	
	30	5/5	
	35	4/5	Mouse euthanized due to >20% body weight loss
Compound **9** Multiple dose*	10	5/5	
	15	3/5	Mice euthanized due to >20% body weight loss
	20	0/5	Mice euthanized due to >20% body weight loss

The MTD found for 4arm-PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) (compound **9**) was 30 mg/kg when given as single dose, and 10 mg/kg when given as multiple dose (q2d x 5).

EXAMPLE 2. Properties of PEG Conjugates

Table 3, below, shows solubility of four different PEG-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) conjugates in aqueous saline solution. All four PEG-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) conjugates showed good solubility of up to 4 mg/mL equivalent of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. In human plasma, 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin was steadily released from the PEG conjugates with a doubling time of 22 to 52 minutes and the release appeared to be pH and concentration dependent as described in the following EXAMPLE 3.

TABLE 3. Properties of PEG-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin Conjugates

Compound	Solubility in Saline (mg/mL)[a]	$t_{1/2}$(min) in Human Plasma[b]	Doubling Time in Plasma (min)[c]		
			Human	Mouse	Rat
Compound **9** (Gly)	180	12.3	31.4	49.5	570
Compound **12** (Ala)	121	12.5	51.9	45.8	753
Compound **23** (Sar)	ND	19.0	28.8	43.4	481
Compound **18** (Met)	142	26.8	22.2	41.9	1920

[a] 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin is not soluble in saline.
[b] PEG conjugate half life.
[c] 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin formation rate from conjugates.

PEG-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin conjugates show good stability in saline and other aqueous medium for up to 24 hours at room temperature.

EXAMPLE 4. Effects Of Concentration and pH on Stability

Based on our previous work, acylation at the 20-OH position protects the lactone ring in the active closed form. The aqueous stability and hydrolysis properties in rat and human plasma were monitored using UV based HPLC methods. 4armPEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) conjugates were incubated with each sample for 5 minutes at room temperature.

Stability of PEG-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin conjugates in buffer was pH dependent. Figure 1 shows 4armPEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) stability in various samples. Figure 2 shows that the rate of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin release from PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) increases with increased pH.

EXAMPLE 5. Pharmacokinetic Properties

Tumor free Balb/C mice were injected with a single injection of 20 mg/kg 4armPEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) conjugates. At various time points mice were sacrificed and plasma was analyzed for intact conjugates and released 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin by HPLC. Pharmacokinetic analysis was done using non-compartmental analysis (WinNonlin). Details are set forth in Table 4, below.

Table 4. Pharmacokinetic Data

Parameter	Compound 9	7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin Released

		from Compound 9
AUC (h*µg/mL)	124,000	98.3
Terminal $t_{½}$ (Hr)	19.3	14.2
C_{max} (µg/mL)	20,500	13.2
CL(mL/hr/kg)	5.3	202
Vss (mL/kg)	131	3094

As shown in Figures 3A and 3B, PEGylation of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin allows long circulation half life and high exposure to native drug 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin. Enterohepatic circulation of 4armPEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) conjugates was observed. The pharmacokinetic profile of PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) in mice was biphasic showing a rapid plasma distribution phase during the initial 2 hours followed by a 18-22 hours terminal elimination half-life for the conjugate and a concomitant 18-26 hours terminal elimination half-life for 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (FIG. 3B).

Additionally, pharmacokinetic profiles of 4arm PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) were investigated in rats. In rats, dose levels of 3, 10 and 30 mg/kg (7-ethyl-10-hydroxycamptothecin equivalent) were used. The pharmacokinetic profiles in rats were consistent with those of mice.

In rats, 4arm PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) showed a biphasic clearance from the circulation with an elimination half life of 12-18 hours in rats. 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin released from 4armPEG-Gly-7-ethyl-10-hydroxycamptothecin conjugates had an apparent elimination half life of 21-22 hours. The maximum plasma concentration (C_{max}) and area under the curve (AUC) increased in a dose dependent manner in rats. The apparent half life of released 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin from 4armPEG-Gly conjugates in mice or rats is significantly longer than the reported apparent half life of released 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin from CPT-11 and the exposure of released 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin from 4arm PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin) is significantly higher than the reported exposure of released 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin from CPT-11. The clearance of the parent compound was 0.35 mL/hr/kg in rats. The estimated volume of distribution at steady state (Vss) of the parent compound was 5.49 mL/kg. The clearance of the released 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin was 131 mL/hr/kg in rats. The estimated Vss of released 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin was 2384 mL/kg in rats. Enterohepatic circulation of released 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin was observed both in mice and rats.

EXAMPLE 6. Therapeutic Efficacy in Human Breast Tumor Xenografted Mice Refractory to Herceptin®

Therapeutic efficacy of HER2 receptor antagonist-containing therapies against a refractory human JIMT-1 breast tumor grown in nude mice was measured. Tumors were established by implanting small tumor fragments into a single subcutaneous site on the left auxiliary flank region of nude mice. The tumor implantation site was observed twice weekly and measured once palpable. The tumor volume for each mouse was determined by measuring two dimensions with calipers and calculated. When tumors reached an average volume of 100 mm^3, the mice were divided into their experimental groups consisting of: untreated controls, Herceptin® only, compound **9** only, and a combination of compound **9** and Herceptin®. Herceptin® was given 5 mg/kg body weight/dose at q7d intraperitoneally. Compound **9** was given 4 mg/kg/dose at q2d x 5 intravenously. For the combination treatment, Herceptin® and compound **9** were given 5 mg/kg/dose at q7d and 4 mg/kg/dose at q2d x 5, respectively. Compound **9** was administered 1 minute following Herceptin® treatment on day 0. On no other day did treatment of compound 9 and Herceptin® coincide. In these experiments, the amount of compound **9** administered was based on the amount of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin, not the amount of polymeric conjugate administered. Mouse weight and tumor sizes were measured at the beginning of the study and at day 28.

The treatment with Herceptin® and compound **9** alone led to about 28% and 51% TGI, respectively as of day 28. The treatment with the combination of Herceptin® and compound **9** resulted in about 81% TGI. The results are set forth in Table 5.

Table 5. Therapeutic Efficacy in JIMT-1 Breast Tumor Xenografted Mouse Model

Treatment	TGI (%)
Control	-
Herceptin® i.p.	28.34
compound **9** i.v.	50.74
Herceptin® i.p. & compound **9** i.v.	80.80

Tumor volume measured at various time points are shown in FIG. 4. A combination of compound **9** and Herceptin® inhibited tumor growth significantly as compared to that of compound **9** or Herceptin® alone. The results show that Herceptin®, when administered with compound **9**, is significantly more effective than either Herceptin® or compound **9** alone in the treatment of breast cancer.

The therapy using compounds described herein in combination with the HER2 receptor antagonist unexpectedly ameliorates and/or avoids resistance associated with HER2

antagonist-containing therapy. The human JIMT-1 breast tumor is refractory to a HER2 antibody such as trastuzumab and pertuzumab. The therapy described herein provides ways to treat cancers refractory to HER2 antagonists more effectively by avoiding and reducing potential drug resistance. Patients and clinicians can benefit from unexpected lack and/or reduction of resistance to HER2 antagonist-containing therapy, when a HER2 antagonist is administered together with the compounds described herein.

EXAMPLE 7. Therapeutic Efficacy in Human Gastric Carcinoma Xenografted Mice

Therapeutic efficacy of HER2 receptor antagonist-containing therapies against a human gastric carcinoma N87 grown in nude mice was determined. Human N87 gastric carcinoma was established in nude mice by subcutaneous injection. Groups of mice were randomly divided and treated with Herceptin® alone, compound **9** alone, and a combination of both. Herceptin® was given 20 mg/kg body weight/dose at q7d intraperitoneally. Compound **9** was given 5 mg/kg/dose at q2d x 5 intravenously. For the combination treatment, compound **9** and Herceptin® were given 5 mg/kg/dose at q2d x 5 and 20 mg/kg/dose at q7d, respectively. The amounts of compound **9** administered were based on the amount of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin.

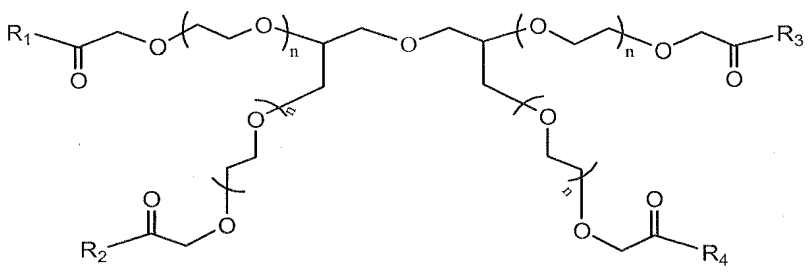
The results are set forth in FIG. 5. Tumors continued to grow in the mice treated with Herceptin® alone. On day 40, tumor volume increased by 613 % compared to day 0. The tumor volume in the mice treated with Herceptin® alone was comparable to the control untreated mice. Herceptin® alone did not inhibit gastric tumor growth. The treatment with compound **9** alone inhibited tumor growth effectively. In the mice treated with the combination of Herceptin® and compound **9**, tumor volume decreased by 23% by day 40 compared to day 0. The tumors receiving combined treatment regressed (below baseline values) from day 5 until day 48 of the study. 71% of animals treated with Herceptin® alone were sacrificed by day 52 due to excessive tumor burden (>1700 mm^3) or tumor ulceration. In the group treated with Herceptin® plus compound **9**, 86% of mice survived until day 95 (the last day of the study). Among the 5 surviving mice (71%) treated with four-arm ^{40K}PEG-Gly-(7-ethyl-10-hydroxycamptothecin), all had tumors <1500 mm^3 by day 80.

The results show that therapeutic efficacy of the HER2 receptor antagonist and survival rate, when administered in combination with the compounds described herein, were enhanced significantly. The treatment described herein provides ways to utilize HER2 antagonist-based therapy more effectively.

Various references are cited herein. The contents of all of which are hereby incorporated by reference herein in their entireties.

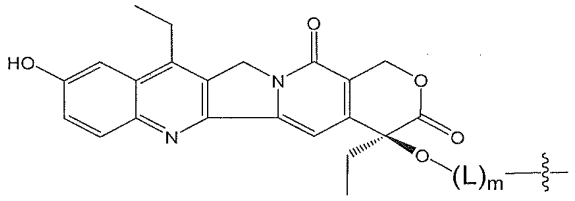
We claim:

1. A method of treating a HER2 positive cancer in a mammal, comprising administering a HER2 receptor antagonist in combination with an effective amount of a compound of Formula (I):

(I) 

wherein

R_1, R_2, R_3 and R_4 are independently OH or



wherein

L is a bifunctional linker;

(m) is 0 or a positive integer, wherein each L is the same or different when (m) is equal to or greater than 2; and

(n) is a positive integer;

provided that R_1, R_2, R_3 and R_4 are not all OH;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof, to said mammal.

2. The method of claim 1, wherein the HER2 receptor antagonist is selected from the group consisting of anti-HER2 antibodies, antisense ErbB2 oligonucleotides, and combinations thereof.

3. The method of claim 2, wherein the anti-HER2 antibodies bind to the extracellular domain of HER2 Domain IV or HER2 Domain II.

4. The method of claim 2, wherein the anti-HER2 antibody comprises trastuzumab or pertuzumab.

5. The method of claim 1, wherein the HER2 positive cancer is metastatic or non-metastatic.

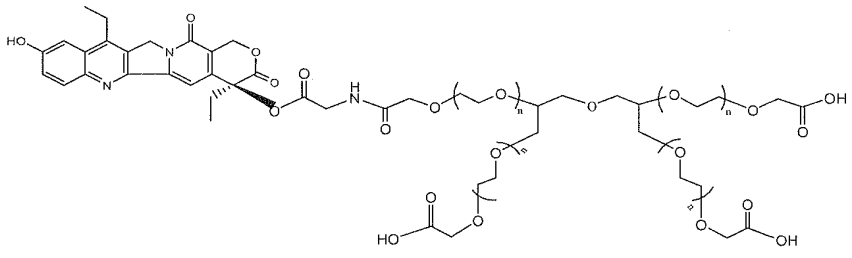
6. The method of claim 1, wherein the HER2 positive cancer is resistant or refractory to the HER2 receptor antagonist.

7. The method of claim 1, wherein the HER2 positive cancer is selected from the group consisting of solid tumors, breast cancer, gastric cancer, ovarian cancer, stomach cancer, uterine cancer, uterine serous endometrial carcinoma, prostate cancer, bladder cancer, salivary gland carcinoma, renal adenocarcinoma, and mammary gland carcinoma.

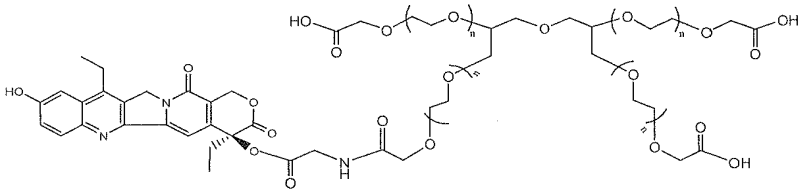
8. The method of claim 1, wherein (n) is an integer of from about 28 to about 341, so that the total molecular weight of the polymeric portion of the compound of Formula (I) ranges from about 5,000 to about 60,000 daltons.

9. The method of claim 8, wherein (n) is an integer of from about 114 to about 239, so that the total molecular weight of the polymeric portion of the compound of Formula (I) ranges from about 20,000 to about 42,000 daltons.

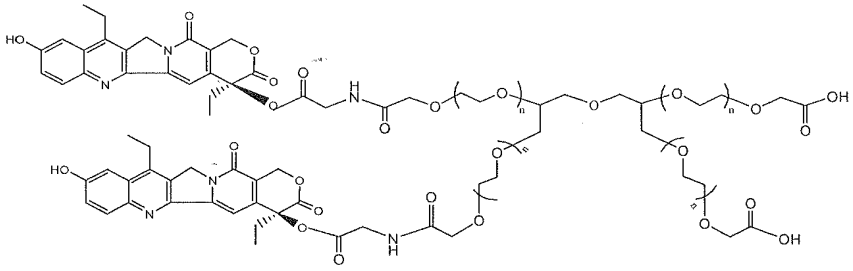
10. The method of claim 1, wherein the compound of Formula (I) is selected from the group consisting of



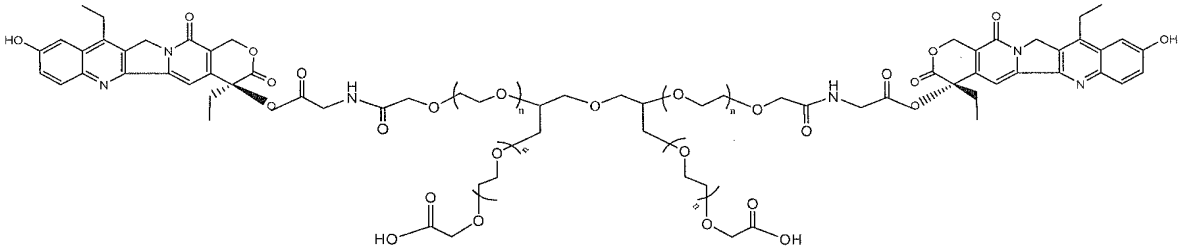
,



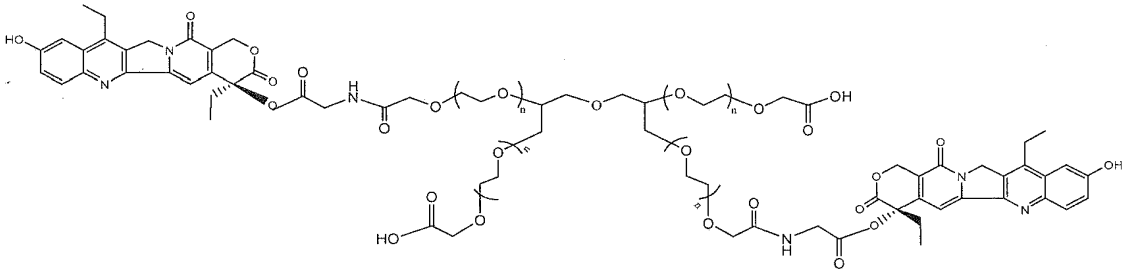
,



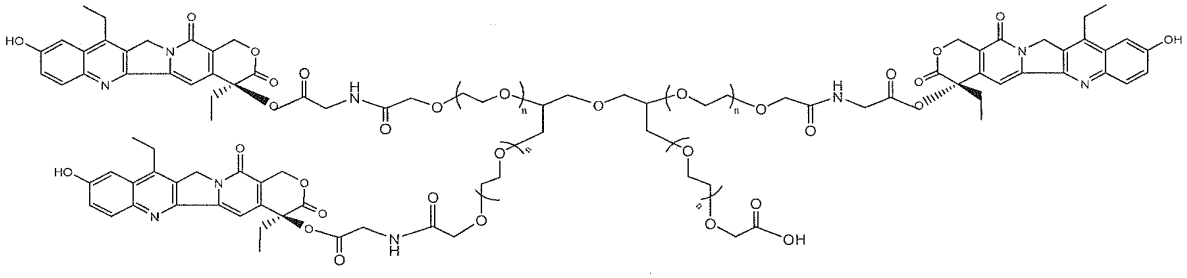
,



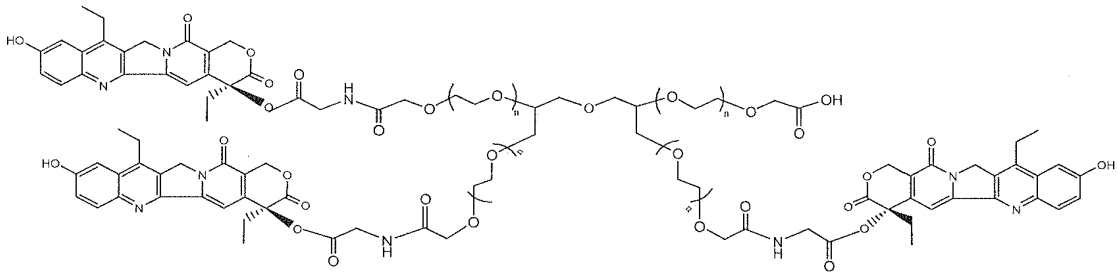
,



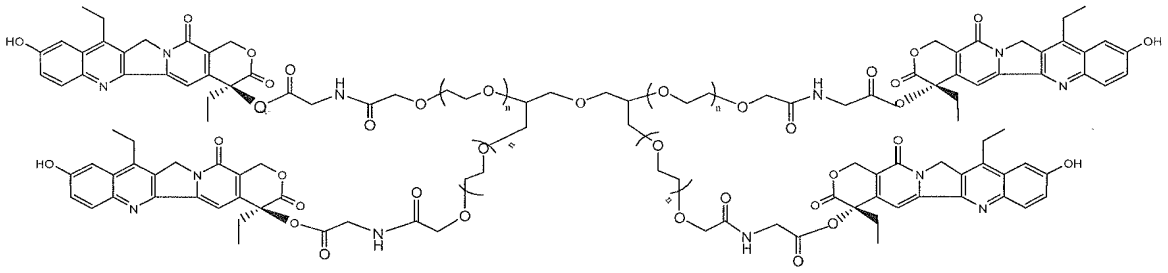
5 ,



,



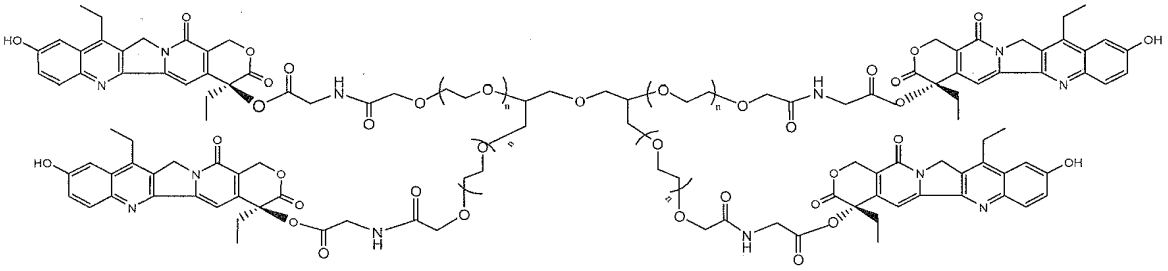
and



.

11. The method of claim 1, wherein the compound of Formula (I) is

(Ia)



.

12. The method of claim 1, wherein the compound of Formula (I) is administered to the mammal, in amounts of from about 0.5 mg/m^2 body surface/dose to about 50 mg/m^2 body surface/dose, and wherein the amount is the weight of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin included in the compound of Formula (I).

13. The method of claim 1, wherein the compound of Formula (I) is administered to the mammal, in amounts of from about 1 mg/m^2 body surface/dose to about 18 mg/m^2 body surface/dose, and the amount is the weight of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin included in

the compound of Formula (I).

14. The method of claim 1, wherein the compound of Formula (I) is administered to the mammal, according to a protocol of from about 1.25 mg/m^2 body surface/dose to about 16.5 mg/m^2 body surface/dose given weekly for three weeks, followed by 1 week without treatment, and the amount is the weight of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin included in the compound of Formula (I).

15. The method of claim 14, wherein the amount administered to the mammal weekly, is about 5 mg/m^2 body surface/dose, and the amount is the weight of 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin included in the compound of Formula (I).

16. The method of claim 4, wherein the anti-HER2 receptor antibody is administered to the mammal, in an amount of from about 2 mg/kg to about 8 mg/kg.

17. The method of claim 2, wherein the antisense ErbB2 oligonucleotide or a pharmaceutically acceptable salt thereof is administered to the mammal, in combination with the compound of Formula (I) or an pharmaceutically acceptable salt thereof.

18. The method of claim 17, wherein the antisense ErbB2 oligonucleotide is complementary to at least 8 consecutive nucleotides of ErbB2 pre-mRNA or mRNA.

19. The method of claim 17, wherein the antisense ErbB2 oligonucleotide comprises from about 8 to 50 nucleotides in length.

20. The method of claim 17, wherein the antisense ErbB2 oligonucleotide comprises nucleotides that are complementary to at least 8 consecutive nucleotides set forth in SEQ ID NO: 1.

21. The method of claim 17, wherein the antisense ErbB2 oligonucleotide comprises one or more phophorothioate internucleotide linkages.

22. The method of claim 17, wherein the antisense ErbB2 oligonucleotide includes one or more locked nucleic acids (LNA).

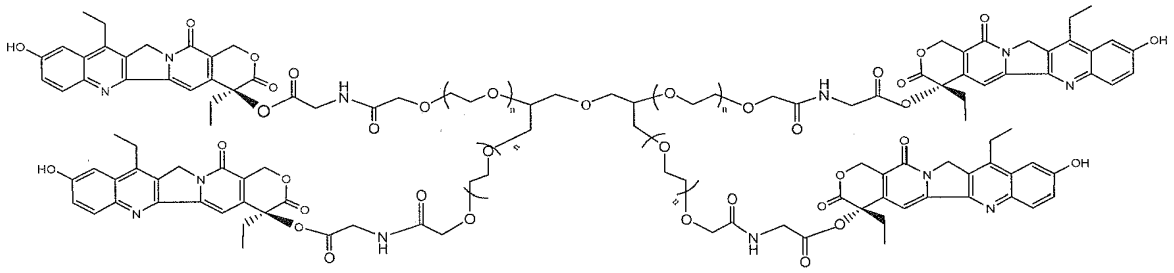
23. The method of claim 17, wherein the antisense ErbB2 oligonucleotide is administered in an amount of from about 2 to about 50 mg/kg/dose.

24. The method of claim 1, further comprising determining the presence of a HER2 HER2 positive cancer in the mammal.

25. A method of treating a HER2 positive cancer in a mammal, comprising:

(a) identifying a mammal having a HER2 positive cancer by determining the presence, in the mammal, of a cancer that overexpresses HER2; and

(b) administering, to the mammal, an effective amount of a HER2 receptor antagonist comprising trastuzumab in combination with an effective amount of a compound of Formula (Ia):



or a pharmaceutically acceptable salt thereof to the mammal having a HER2 positive cancer,

wherein (n) is about 227 so that the total molecular weight of the polymeric portion of the compound of Formula (Ia) is about 40,000 daltons.

26. A method of increasing HER2 receptor antagonist effects in a mammal having a HER2 positive cancer, comprising administering, to the mammal, a HER2 receptor antagonist in combination with an effective amount of a compound of Formula (I) of claim 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

27. A method of inhibiting the growth or proliferation of HER2 positive cells in a mammal, comprising

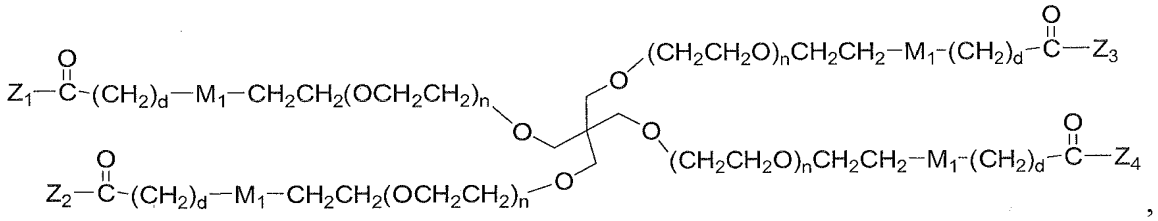
(a) determining the presence of a HER2 expression in cells in a mammal; and

(b) administering a HER2 receptor antagonist, to the mammal, in combination with a compound of Formula (I) of claim 1 or a pharmaceutically acceptable salt thereof to a mammal having HER2 positive cells.

28. A method of treating a HER2 positive cancer in a mammal, comprising administering to said mammal a HER2 receptor antagonist in combination with an effective amount of a camptothecin, a camptothecin analog, a polymeric conjugate of a camptothecin or analog thereof, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

29. The method of claim 28, wherein the polymeric conjugate is a compound of Formula (II) or Formula (III):

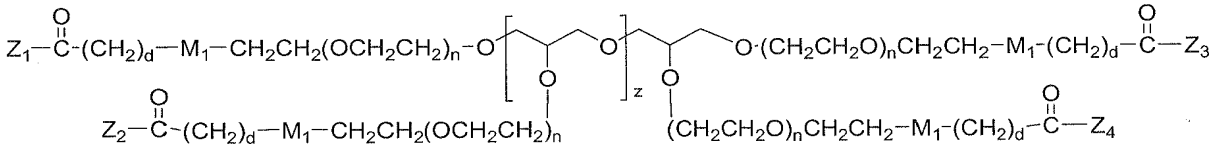
(II)



,

or

(III)



,

wherein

Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are independently OH or $(L)_m$-D;

L is a bifunctional linker;

D is a camptothecin or a camptothecin analog;

M_1 is O, S, or NH;

(d) is zero or a positive integer of from about 1 to about 10;

(z) is zero or a positive integer of from 1 to about 29;

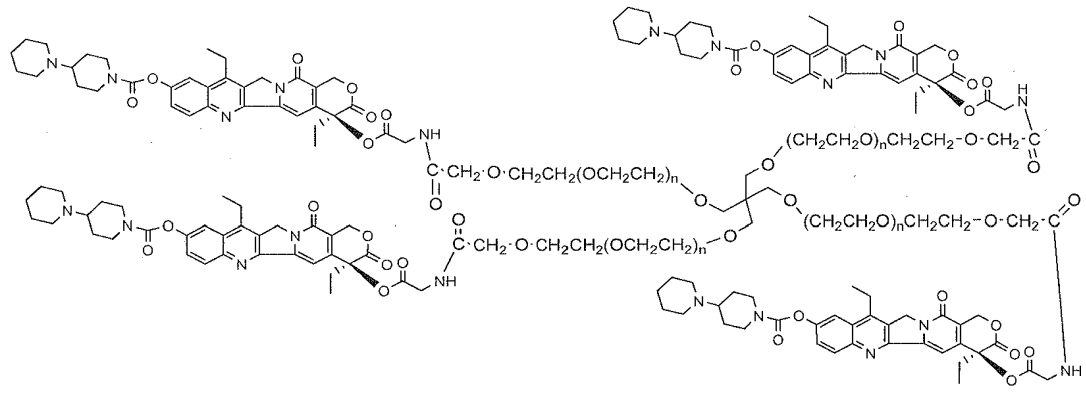
(m) is 0 or a positive integer; and

(n) is a positive integer of from about 10 to about 2,300 so that the polymeric portion of the compound has the total number average molecular weight of from about 2,000 to about 100,000 daltons,

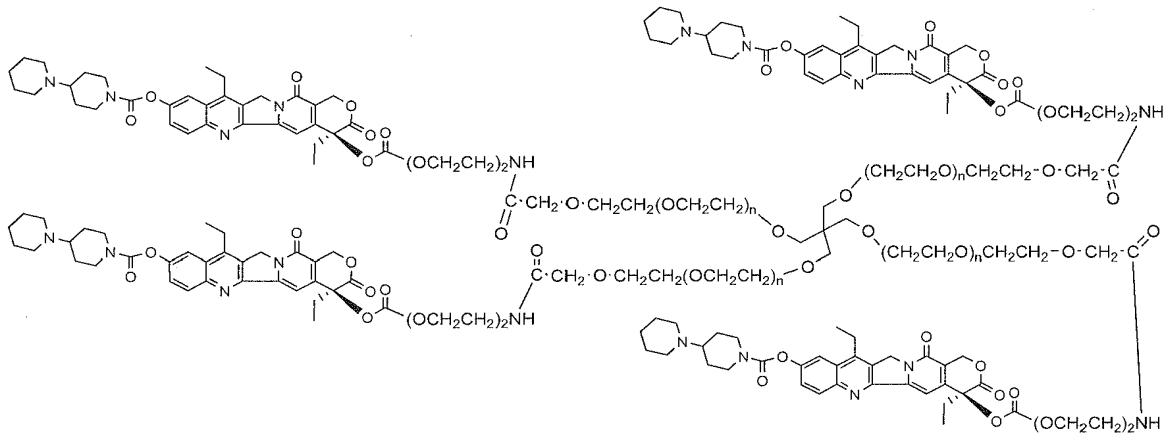
provided that Z_1, Z_2, Z_3 and Z_4 are not all OH.

30. The method of claim 29, wherein D is selected from the group consisting of camptothecin, SN38, topotecan, and CPT-11.

31. The method of claim 29, wherein the polymeric conjugate is



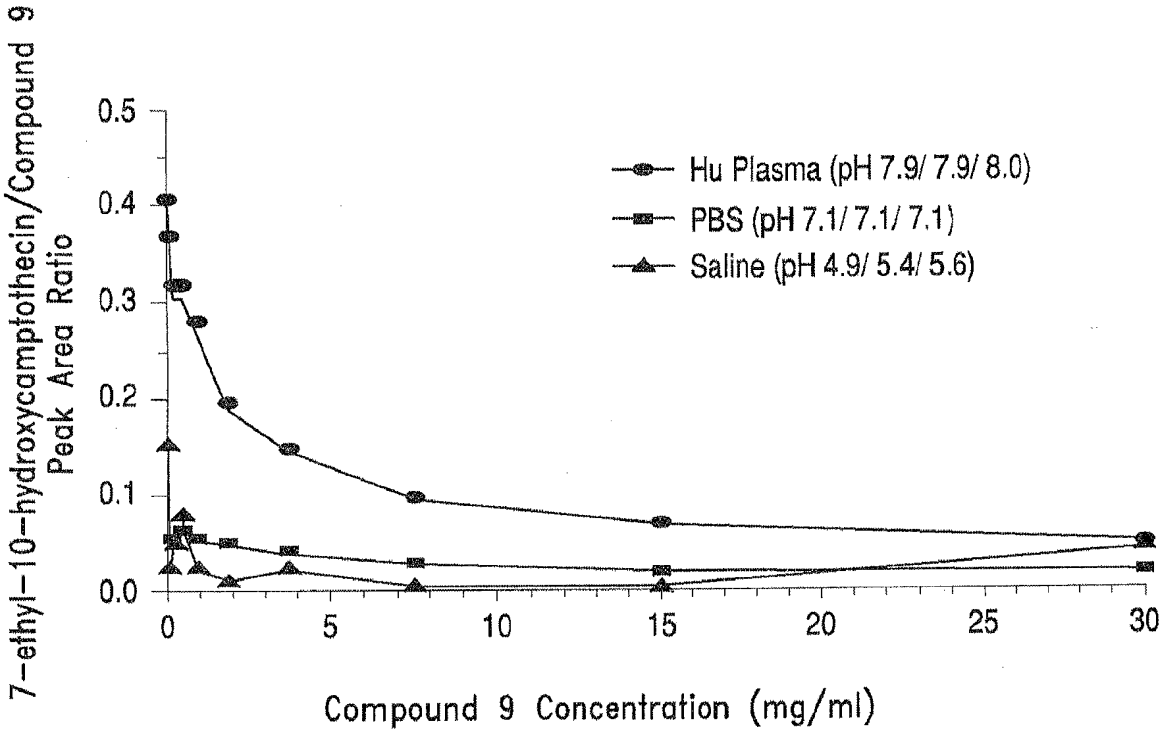
or



wherein (n) is an integer of from about 28 to about 341, so that the total molecular weight of the polymeric portion of the compound of Formula (II) ranges from about 5,000 to about 60,000 daltons.

1/5

FIG. 1


7-ethyl-10-hydroxycamptothecin/Compound 9
Peak Area Ratio
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
5
10
15
20
25
30
Compound 9 Concentration (mg/ml)
Hu Plasma (pH 7.9/ 7.9/ 8.0)
PBS (pH 7.1/ 7.1/ 7.1)
Saline (pH 4.9/ 5.4/ 5.6)

2/5

FIG. 2

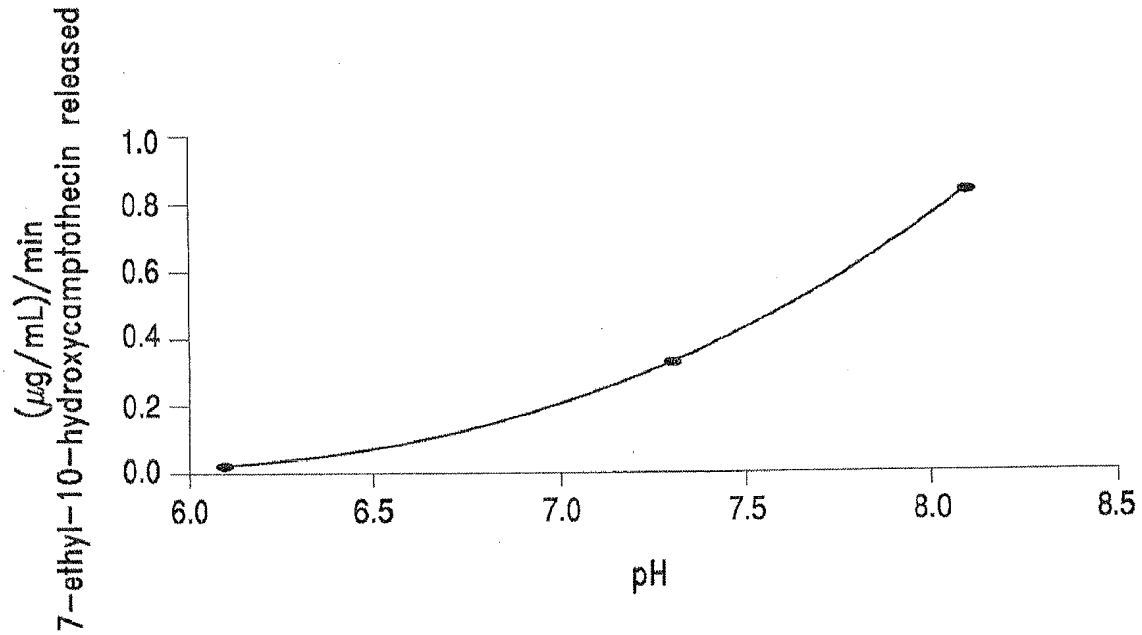

7-ethyl-10-hydroxycamptothecin released
(μg/mL)/min
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
pH

FIG. 3A

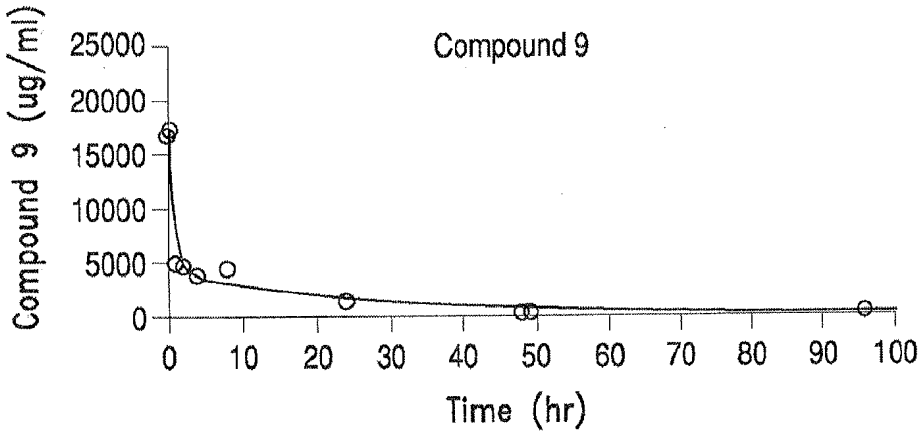

Compound 9
Compound 9 (ug/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Time (hr)

FIG. 3B

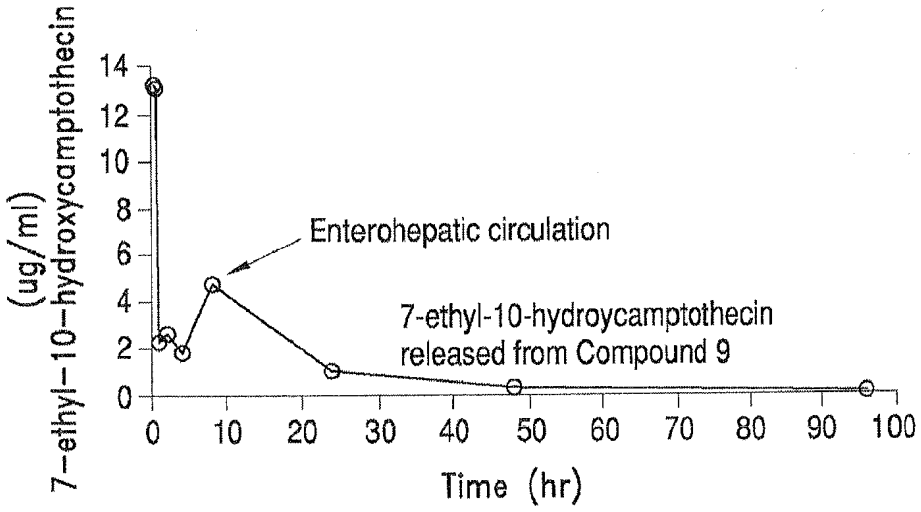

7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (ug/ml)
14
12
10
8
6
4
2
0
Enterohepatic circulation
7-ethyl-10-hydroycamptothecin
released from Compound 9
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Time (hr)

FIG. 4

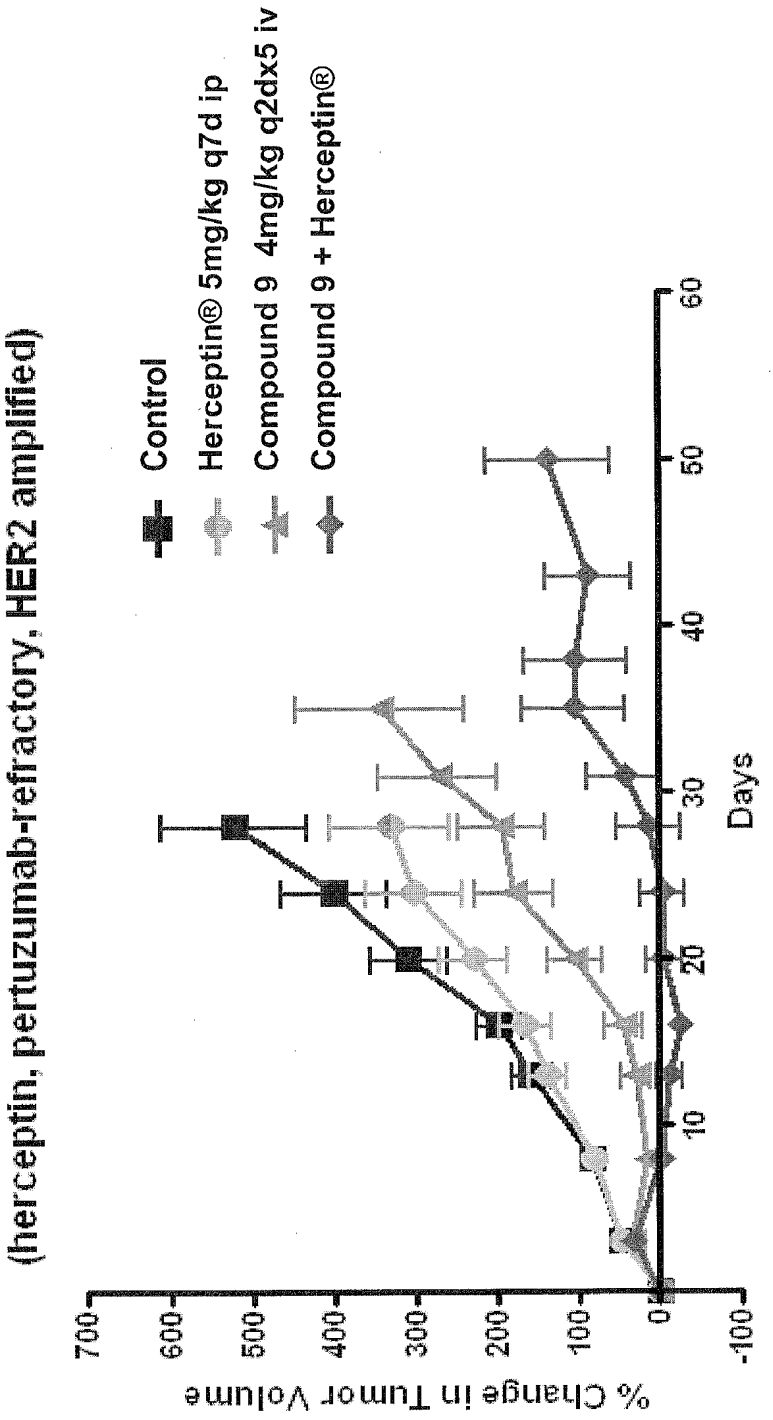
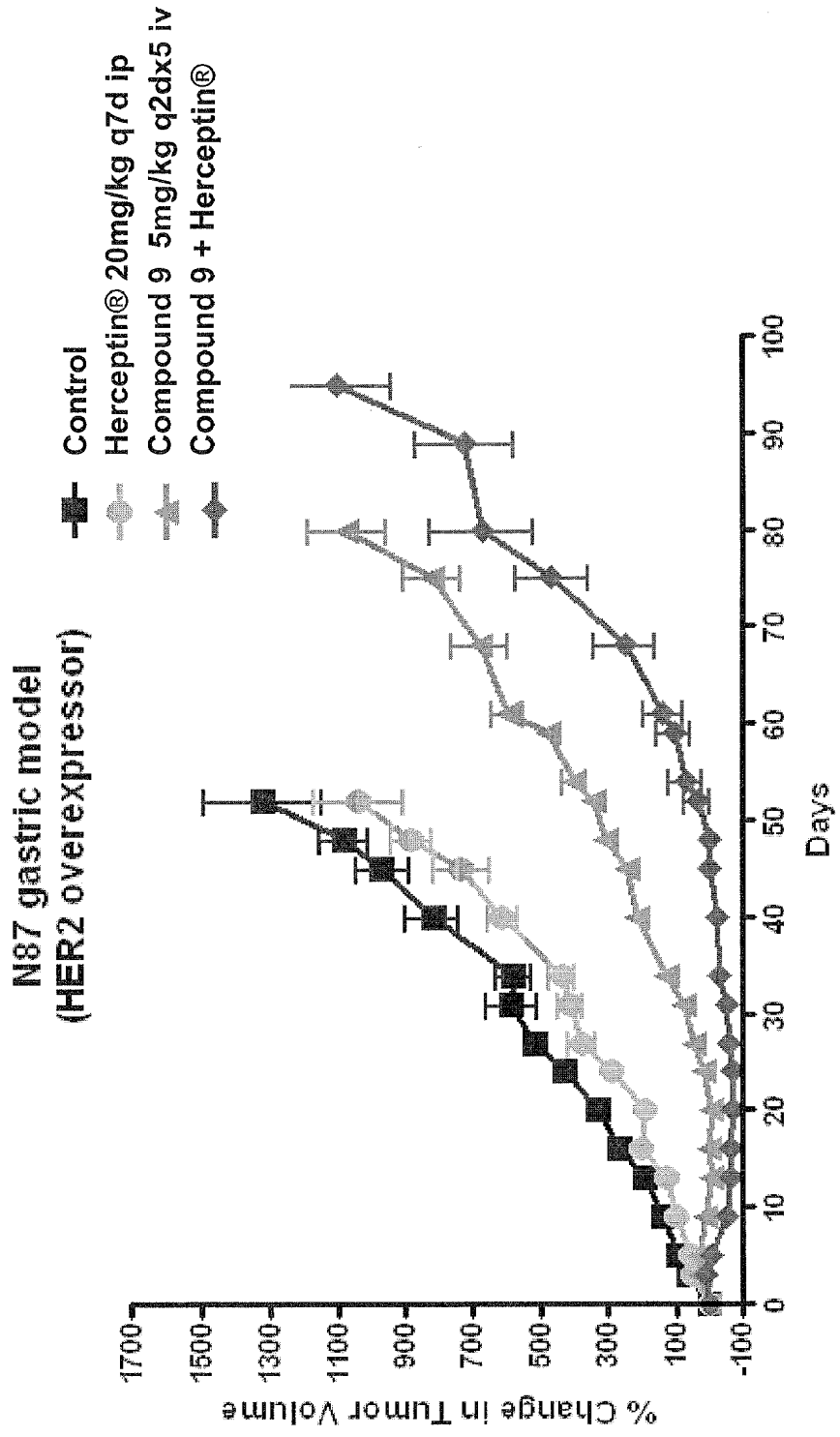

JIMT-1 breast model
(herceptin, pertuzumab-refractory, HER2 amplified)
Control
Herceptin® 5mg/kg q7d ip
Compound 9 4mg/kg q2dx5 iv
Compound 9 + Herceptin®
% Change in Tumor Volume
Days
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
10
20
30
40
50
60

FIG. 5


N87 gastric model
(HER2 overexpressor)
Control
Herceptin® 20mg/kg q7d ip
Compound 9 5mg/kg q2dx5 iv
Compound 9 + Herceptin®
% Change in Tumor Volume
1700
1500
1300
1100
900
700
500
300
100
-100
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
Days

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 10/42686

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395; A61K 31/44 (2010.01)
USPC - 424/155.1; 514/283
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
USPC- 424/155.1; 514/283

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC- 424/142.1; 514/17; 514/171; 514/183; 514/251; 514/254.07; 514/263.32; 514/320; 514/34; 514/44R; 514/49; 514/493; 514/54; 514/575; 514/650; 514/651; 514/8 (keywords below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar: Her2, camptothecin conjugate, PEG, trastuzumab, petuzumab, antisense, LNA
GenCore 6.3: SEQ ID NO:1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X --- Y	US 2008/0102069 A1 (Friess et al.) o1 May 2008 (01.05.2008) para [0009], [0015], [0018], [0039], [0078], [0081]-[0082]	28 --- 1-27, 29-31
Y	US 7,462,627 B2 (Zhao et al.) 09 December 2008 (09.12.2008) col 1, ln 44-53, col 4, ln 3-4, col 9, ln 1-67, col 15, ln 1-38, col 17, ln 57 to col 18, ln 4	1-27
Y	US 2008/0194612 A1 (Zhao et al.) 14 August 2008 (14.08.2008) para [0011], [0030], [0136], [0139], [0155]-[0156]	29-31
Y	US 6,395,266 B1 (Martinez et al.) 28 May 2002 (28.05.2002) col 11, ln 10-30; col 23, ln 1-29 and 44-60	12-15
Y	US 5,968,748 A (Bennett et al.) 19 October 1999 (19.10.1999) col 12, ln 1-16, col 17, ln 10-30, ln 36-55, SEQ ID NO 1	17-23
Y	US 2009/0105139 A1 (Kole et al.) 23 April 2009 (23.04.2009) para [0015], [0018]	22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

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

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
02 November 2010 (02.11.2010)	08 NOV 2010
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

OnCusp
Ex. 1038

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2011 年 2 月 24 日(24.02.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/021397 A1

(51) 国際特許分類:
C07C 225/20 (2006.01) *C07C 233/32* (2006.01)
A61K 31/135 (2006.01) *C07C 233/41* (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01) *C07C 271/24* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2010/005136

(22) 国際出願日: 2010 年 8 月 20 日(20.08.2010)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2009-191464 2009 年 8 月 20 日(20.08.2009) JP
特願 2010-046498 2010 年 3 月 3 日(03.03.2010) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人千葉大学 **(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION CHIBA UNIVERSITY)** [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号 Chiba (JP). 株式会社ヤクルト本社 **(KABUSHIKI KAISHA YAKULT HONSHA)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋１丁目１番１９号 Tokyo (JP).

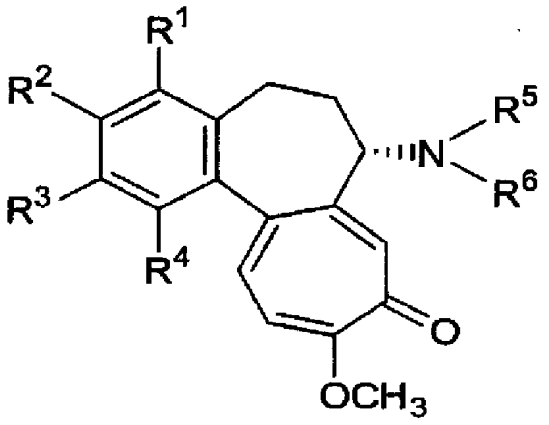
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高山 廣光 **(TAKAYAMA, Hiromitsu)** [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 八十歩 直子 **(YASOBU, Naoko)** [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 北島 満里子 **(KITAJIMA, Mariko)** [JP/JP]; 〒2638522 千葉県千葉市稲毛区弥生町１番３３号 国立大学法人千葉大学大学院薬学研究院内 Chiba (JP). 八重樫 隆 **(YAEGASHI, Takashi)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋１丁目１番１９号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 松崎 健 **(MATSUZAKI, Takeshi)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋１丁目１番１９号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 長岡 正人 **(NAGAOKA, Masato)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋１丁目１番１９号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 橋本 秀介 **(HASHIMOTO, Shusuke)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋１丁目１番１９号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 西山 裕之 **(NISHIYAMA, Hiroyuki)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋１丁目１番１９号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 杉本 卓弥 **(SUGIMOTO, Takuya)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋１丁目１番１９号 株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP). 小野 雅弘 **(ONO, Masahiro)** [JP/JP]; 〒1058660 東京都港区東新橋１

[続葉有]

(54) **Title**: COLCHICINE DERIVATIVES

(54) 発明の名称 : コルヒチン誘導体



(1)

(57) **Abstract**: Provided are 4-modified colchicine compounds and medicines using the same. Specifically provided are colchicine derivatives represented by general formula (1), salts thereof, and solvates of the same. In general formula (1), R^1 is a halogen atom, a hydroxyl group, a nitro group, an amino group, or a mono-, di- or tri-fluoromethyl group; R^2, R^3 and R^4 are each a methoxy group or a hydroxyl group, or alternatively R^2 and R^3, or R^3 and R^4 together represent a methylenedioxy group; R^5 and R^6 may be the same or different and are each a hydrogen atom, a C_{1-6} alkyl group, an arylalkyl group, a C_{2-6} alkenyl group, -COR^7, -$COOR^8$, -SO_2R^9, -$CONR^{10}R^{11}$, or -$CSNR^{12}R^{13}$, or alternatively R^5 and R^6 together with the nitrogen atom to which R^5 and R^6 are bonded may form a three- to seven-membered cyclic amino group; R^7 is a C_{1-6} alkyl group or the like; R^8 is a C_{1-6} alkyl group or the like; R^9 is a C_{1-6} alkyl group or the like; R^{10} and R^{11} may be the same or different and are each a hydrogen atom, a C_{1-6} alkyl group, or the like; and R^{12} and R^{13} may be the same or different and are each a hydrogen atom, an alkyl group, or the like.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2011/021397 A1

OnCusp
Ex. 1038

WO 2011/021397 A1

丁目１番１９号　株式会社ヤクルト本社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町１丁目３番８号　沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).

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

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

コルヒチンの４位修飾化合物及びこれを用いた医薬を提供する。　次の一般式（１）　（式中、R^1はハロゲン原子、ヒドロキシ基、ニトロ基、アミノ基又はモノ－、ジ－若しくはトリ－フルオロメチル基を示し；　R^2、R^3及びR^4はそれぞれメトキシ基、又はヒドロキシ基を示すか、R^2とR^3又はR^3とR^4が一緒になってメチレンジオキシ基を示し；　R^5及びR^6は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、アリールアルキル基、炭素数２～６のアルケニル基、－ＣＯＲ^7、－ＣＯＯＲ^8、－ＳＯ$_2$Ｒ^9、－ＣＯＮＲ^{10}Ｒ^{11}又は－ＣＳＮＲ^{12}Ｒ^{13}を示すか、R^5とR^6が結合する窒素原子と一緒になって３～７員の環状アミノ基を示し；　R^7は炭素数１～６のアルキル基等を示し；　R^8は炭素数１～６のアルキル基等を示し；　R^9は炭素数１～６のアルキル基等を示し；　R^{10}及びR^{11}は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基等を示し；　R^{12}及びR^{13}は同一又は異なって、水素原子、アルキル基等を示す。）　で表されるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物。

OnCusp
Ex. 1038

明　細　書

発明の名称 ： コルヒチン誘導体

技術分野

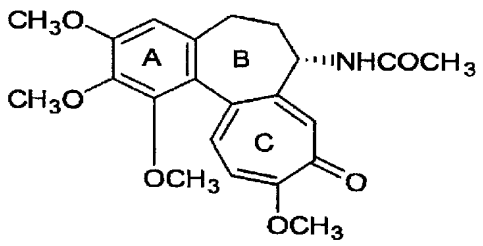
[0001] 本発明は、抗癌剤等の医薬として有用なコルヒチン誘導体及びこれを含有する医薬に関する。

背景技術

[0002] コルヒチンは、トロポロン環を有するイソキノリンアルカロイドの一種であり、ユリ科イヌサフランの種子や球根に多く含まれており、古くから痛風の治療薬として用いられてきた。コルヒチンは、チューブリンに結合することにより細胞分裂を抑制する作用を有することが見出され、当該チューブリンは細胞骨格として細胞の構造を維持するだけでなく、シグナル伝達における輸送路としても作用し、細胞分裂において紡錘体を形成する機能を有する。従って、コルヒチンは、ビンブラスチンやタキソールと同様に抗癌剤として有用であるとして注目された。しかし、コルヒチンは正常細胞の分裂も抑制してしまうため、実用化には至っていない。

[0003] コルヒチンをリード化合物として種々の誘導体が合成され、その生物活性に関する報告がなされている。その中で、コルヒチンは、Ａ環とＣ環を介してチューブリンと相互作用することが明らかとなり、Ａ環やＣ環の置換基の修飾やＣ環をベンゼン環に変えた化合物などが合成されている（非特許文献１～８）。

[0004] [化1]



コルヒチン

[0005] 近年では、Ｂ環部分がチューブリンへの不可逆的な結合に関与しているのではないかと考えられるようになり、Ｂ環側鎖を変換したコルヒチン誘導体も注目を集めている（非特許文献９、１０）。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．，１９７６，２５，１３８３－１３８７

非特許文献2：Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９８５，２８，１２０４－１２０８

非特許文献3：Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，１９８１，２４，２５７－２６１

非特許文献4：Ａｒｃｈ．Ｐｈａｒｍ．Ｃｈｅｍ．Ｌｉｆｅ Ｓｃｉ．，２００５，３３８，５８２－５８９

非特許文献5：Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，１９８２，２１，５３４－５４３

非特許文献6：Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｊ．，１９９７，３２７，６５８－６８８

非特許文献7：Ｈｅｔｅｒｏｃｙｃｌｅｓ，２００５，６５，５４１－５５１

非特許文献8：Ｂｉｏｏｒｇ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．，２００５，１５，２３５－２３８

非特許文献9：Ｊ．Ｏｒｇ．Ｃｈｅｍ．，２００４，６９，８９８７－８９９６

非特許文献10：Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２００５，４４，３２４９－３２５８

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、従来のコルヒチンのＡ環部分の修飾は、そのほとんどが、１～３位のメトキシ基の変換であり、４位への修飾はほとんど行われていなかった。

従って、本発明の課題は、コルヒチンの４位修飾化合物及びこれを用いた

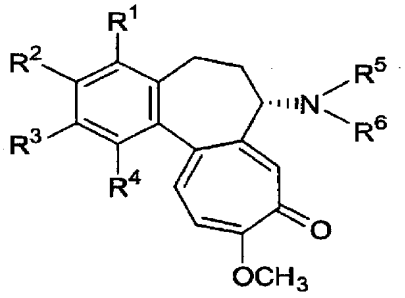
医薬を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] そこで、本発明者は、コルヒチンのＡ環の４位にハロゲン原子等の置換基を導入し、かつＢ環の側鎖を変換したところ、優れた抗癌活性を有し、かつ毒性が低い化合物が得られ、当該化合物は抗癌剤等の医薬として有用であることを見出し、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は、次の一般式（１）

[0010] [化2]



（１）

[0011] （式中、R^1はハロゲン原子、ヒドロキシ基、ニトロ基、アミノ基又はモノー、ジー若しくはトリーフルオロメチル基を示し；

R^2、R^3及びR^4はそれぞれメトキシ基、又はヒドロキシ基を示すか、R^2とR^3又はR^3とR^4が一緒になってメチレンジオキシ基、又はエチレンジオキシ基を示し；

R^5及びR^6は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、アリールアルキル基、炭素数２～６のアルケニル基、－ＣＯＲ^7、－ＣＯＯＲ^8、－SO_2R^9、－ＣＯＮＲ^{10}Ｒ^{11}又は－ＣＳＮＲ^{12}Ｒ^{13}を示すか、R^5とR^6が結合する窒素原子と一緒になって３～７員の環状アミノ基を示し；

R^7は水素原子、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、環状アミノ基、炭素数３～７の環状アルキル基又は炭素数１～６のアルキル基を示し、当該アルキル基には環状アルキル基、ハロゲン原子、アミノ基、アルキルアミノ基、アリールアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、アルコキシカルボニルアミノ基、アリールアミノ基、ヘテロアリールアミ

ノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、ヒドロキシ基、アシルオキシ基、ジアルキルアミノアシルオキシ基、アルキルオキシ基、アリール基、アリールオキシ基、アリールアルキルオキシ基、ヘテロアリール基、ヘテロアリールオキシ基、チオール基、アシルチオ基、ジアルキルアミノアシルチオ基、アルキルチオ基、アルキルスルホニル基、アリールチオ基、ヘテロアリールチオ基、カルバモイルオキシ基及び環状アミノカルボニルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該アリール基にはハロゲン原子、アルコキシ基、ニトロ基、シアノ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルキル基、アリール基、アルキルアミノアルキル基及びヒドロキシアルキルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはアルキル基、アルコキシカルボニル基及びアシル基から選ばれる１～２個が置換していてもよい；

R^8は炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、炭素数３～７の環状アルキル基又は環状アミノ基を示し、当該アルキル基にはアミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アリール基及びヘテロアリール基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはアルキル基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～２個が置換していてもよく、当該環状アルキル基にはカルボキシル基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～３個が置換していてもよい；

R^9は炭素数１～６のアルキル基、炭素数３～７の環状アルキル基、炭素数６～１４のアリール基又はヘテロアリール基を示し、当該アルキル基には１～３個のハロゲン原子が置換していてもよく、当該アリール基には１～３個のアルキル基が置換していてもよい；

R^{10}とR^{11}は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、炭素数３～７の環状アルキル基又は炭素数１～７のアシル基を示すか、R^{10}とR^{11}が結合する窒素原子と一緒になって３～７員環の環状アミノ基を示し、当該アルキル基にはアリール

OnCusp
Ex. 1038

基及びヘテロアリール基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、炭素数１～７のアシル基には１～３個のハロゲン原子が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはさらに酸素原子、窒素原子又は硫黄原子が含まれていてもよい；

R^{12}とR^{13}は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基又は炭素数３～７の環状アルキル基を示すか、R^{12}とR^{13}が結合する窒素原子と一緒になって３～７員環の環状アミノ基を示し、当該アルキル基にはアリール基、ヘテロアリール基、環状アミノ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、ヒドロキシ基及びアルキルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アルキル基には１～３個のヒドロキシ基が置換していても良く、当該アリール基にはジアルキルアミノ基、アルキルオキシ基、アルキル基、シアノ基、ハロゲン原子、ヒドロキシアルキル基、ヒドロキシアルキルオキシ基、スルファモイル基及びヒドロキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該ヘテロアリール基にはアルキル基、シアノ基、アリール基及びヒドロキシアルキル基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはさらに酸素原子、窒素原子又は硫黄原子が含まれていてもよく、さらにアルキル基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基、アシル基及びジアルキルアミノ基から選ばれる１～３個が置換していてもよい；

ただし、R^{1}が塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子であり、R^{2}、R^{3}及びR^{4}がメトキシ基であり、R^{5}が水素原子であり、かつR^{6}がアセチル基である場合を除く。R^{1}がヒドロキシ基のとき、R^{2}、R^{3}及びR^{4}はメトキシ基である。）で表されるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物を提供するものである。

[0012] また、本発明は、一般式（１）で表されるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物を含有する医薬を提供するものである。

また、本発明は、一般式（１）で表されるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物、及び薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物を提

供するものである。

また、本発明は、一般式（１）で表されるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物を含有する抗癌剤を提供するものである。

また、本発明は、一般式（１）で表される治療用のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物を提供するものである。

また、本発明は、一般式（１）で表されるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物の有効量を投与することを特徴とする癌の治療方法を提供するものである。

発明の効果

[0013] 本発明のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ及びｉｎ　ｖｉｖｏで優れた抗癌活性を有し、かつ毒性が低いので抗癌剤として有用である。

発明を実施するための形態

[0014] 本発明のコルヒチン誘導体は、一般式（１）で表されるように、Ａ環の４位（R^1）にハロゲン原子、ヒドロキシ基、ニトロ基、アミノ基又はモノ－、ジ－若しくはトリ－フルオロメチル基という特定の置換基を有する点に特徴がある。特にR^1がハロゲン原子である本発明化合物の抗癌活性は強力であり、毒性も低い。

[0015] 一般式（１）中、R^1は、ハロゲン原子、ヒドロキシ基、ニトロ基、アミノ基又はモノ－、ジ－若しくはトリ－フルオロメチル基を示すが、このうちハロゲン原子が特に好ましい。ここで、ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子が挙げられる。

[0016] 一般式（１）中、R^2、R^3及びR^4はそれぞれメトキシ基、又はヒドロキシ基を示すか、R^2とR^3又はR^3とR^4が一緒になってメチレンジオキシ基、又はエチレンジオキシ基を示す。R^1がヒドロキシ基の場合は、R^2、R^3及びR^4はすべてメトキシ基である。

[0017] R^5及びR^6は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、アリールアルキル基、炭素数２～６のアルケニル基、－ＣＯＲ^7、－ＣＯＯＲ^8、

－ＳＯ$_2$Ｒ^9、－ＣＯＮＲ^{10}Ｒ^{11}又は－ＣＳＮＲ^{12}Ｒ^{13}を示すか、Ｒ^{5}とＲ^{6}が結合する窒素原子と一緒になって３～７員の環状アミノ基を示す。ここで、炭素数１～６のアルキル基としては、メチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、ｎ－ブチル基、イソブチル基、Ｓｅｃ－ブチル基、ｔｅｒｔ－ブチル基、ｎ－ペンチル基、ｎ－ヘキシル基等の直鎖又は分岐鎖のアルキル基が挙げられるが、炭素数１～４のアルキル基がより好ましく、特にメチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソブチル基が好ましい。アリールアルキル基としては、ベンジル基、フェネチル基等が挙げられるがベンジル基が好ましい。炭素数２～６のアルケニル基としてはビニル基、アリル基、２－ブテニル基、イソブテニル基等が挙げられるが、炭素数３～５の直鎖又は分岐鎖のアルケニル基がより好ましく、特にアリル基、イソブテニル基が好ましい。

[0018] 上記－ＣＯＲ^{7}におけるＲ^{7}は、水素原子、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、環状アミノ基、炭素数３～７の環状アルキル基又は炭素数１～６のアルキル基を示し、当該アルキル基には環状アルキル基、ハロゲン原子、アミノ基、アルキルアミノ基、アリールアルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、アルコキシカルボニルアミノ基、アリールアミノ基、ヘテロアリールアミノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、ヒドロキシ基、アシルオキシ基、ジアルキルアミノアシルオキシ基、アルキルオキシ基、アリール基、アリールオキシ基、アリールアルキルオキシ基、ヘテロアリール基、ヘテロアリールオキシ基、チオール基、アシルチオ基、ジアルキルアミノアシルチオ基、アルキルチオ基、アルキルスルホニル基、アリールチオ基、ヘテロアリールチオ基、カルバモイルオキシ基及び環状アミノカルボニルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該アリール基にはハロゲン原子、アルコキシ基、ニトロ基、シアノ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、アルキル基、アリール基、アルキルアミノアルキル基及びヒドロキシアルキルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはアルキル基、アルコキ

シカルボニル基及びアシル基から選ばれる１～２個が置換していてもよい。ここで、炭素数１～６のアルキル基としては、前記R^5及びR^6と同様の基が挙げられ、炭素数１～４のアルキル基が好ましく、特にメチル基、エチル基、ｎ－プロピル基、イソプロピル基、イソブチル基が好ましい。また、炭素数６～１４のアリール基としては、フェニル基、ナフチル基、トリル基、キシリル基等が挙げられるが、フェニル基が特に好ましい。ヘテロアリール基としては、フリル基、チエニル基、ピロリル基、チアゾリル基、チアジアゾリル基、ピラゾリル基、ピリジニル基、ピラジニル基、ピリミジニル基、ピリダジニル基、オキサゾリル基、イミダゾリル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、インドリル基、ピラジニル基、インダゾリル基、ベンゾチアジアゾリル基、ベンゾイミダゾリル基、ベンゾチアゾリル基、チアジアゾリル基、イソオキサゾリル基、トリアゾリル基等が挙げられるが、フリル基、チエニル基、ピロリル基、ピリジニル基、ベンゾチアゾリル基、ベンゾオキサゾリル基、インドリル基が特に好ましい。環状アミノ基としては、ピロリジノ基、ピペリジノ基、Ｎ－メチルピペリジノ基、Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）ピペリジノ基、Ｎ－アセチルピペリジノ、Ｎ－ベンゾイルピペリジノ、Ｎ－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジノ基等が挙げられるが、Ｎ－メチルピペリジノ基、Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）ピペリジノ基、Ｎ－ベンゾイルピペリジノ、Ｎ－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジノ基が特に好ましい。炭素数３～７の環状アルキル基としては、シクロプロピル基、シクロブチル基、シクロペンチル基、シクロヘキシル基等が挙げられ、炭素数３～６の環状アルキル基が好ましく、シクロプロピル、シクロペンチル基、シクロヘキシル基が特に好ましい。

[0019] R^7で示されるアルキル基上の置換基のうち、環状アルキル基としては、炭素数３～７の環状アルキル基、例えばシクロプロピル基、シクロヘキシル基が挙げられる。ハロゲン原子としては、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子が挙げられる。アルキルアミノ基としては、C_{1-6}アルキルアミノ基、例えばメチルアミノ基、エチルアミノ基が挙げられる。アリールアルキル

OnCusp
Ex. 1038

アミノ基としては、例えばベンジルアミノ基が挙げられる。ジアルキルアミノ基としては、ジ（C_{1-6}アルキル）アミノ基、例えばジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基が挙げられる。環状アミノ基としては、C_{3-7}環状アミノ基、例えばアジリジノ基、ピロリジノ基、ピペリジノ基等が挙げられる。アルコキシカルボニルアミノ基としては、ｔ－ブトキシカルボニルアミノ基等が挙げられる。アリールアミノ基としては、アニリノ基等が挙げられる。ヘテロアリールアミノ基としては、フリルアミノ基、チエニルアミノ基、ピリジニルアミノ基等が挙げられる。アルコキシカルボニル基としては、C_{1-67}アルコキシカルボニル基、例えばメトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、tert-ブチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基等が挙げられる。アシルオキシ基としては、C_{1-6}アシルオキシ基、例えばアセチルオキシ基、プロピオニルオキシ基等が挙げられる。ジアルキルアミノアシルオキシ基としては、ジ（C_{1-6}アルキル）アミノアシルオキシ基、例えばジメチルアミノアセチルオキシ基、ジエチルアミノアセチルオキシ基、ジメチルアミノプロピオニルオキシ基、ジエチルアミノブチロイルオキシ基等が挙げられる。アルキルオキシ基としては、C_{1-6}アルキルオキシ基、例えばメトキシ基、エトキシ基等が挙げられる。アリール基としては、例えばフェニル基、トリル基等が挙げられる。アリールオキシ基としては、例えばフェニルオキシ基、トリルオキシ基等が挙げられる。アリールアルキルオキシ基としては、例えばベンジルオキシ基、トリフェニルメチルオキシ基等が挙げられる。ヘテロアリール基としては、ピリジル基、フリル基、オキサゾリル基等が挙げられる。ヘテロアリールオキシ基としては、例えばピリジルオキシ基、フリルオキシ基、オキサゾリルオキシ等が挙げられる。アシルチオ基としては、C_{1-6}アシルチオ基、例えばアセチルチオ基、プロピオニルチオ基が挙げられる。ジアルキルアミノアシルチオ基としては、ジ（C_{1-6}アルキル）アミノアシルチオ基、例えばジメチルアミノアセチルチオ基、ジメチルアミノプロピオニルチオ基、ジエチルアミノアセチルチオ基、ジエチルアミノブチリルチオ基等が挙げられる。アルキルチオ基としては、C_{1-6}アルキルチオ基、例えばメチルチオ基、エ

OnCusp
Ex. 1038

チルチオ基等が挙げられる。アルキルスルホニル基としては、C_{1-6}アルキルスルホニル基、例えばメチルスルホニル基、エチルスルホニル基等が挙げられる。アリールチオ基としては、例えばフェニルチオ基、トリルチオ基等が挙げられる。ヘテロアリールチオ基としては、例えばピリジルチオ基、フリルチオ基、オキサゾリルチオ等が挙げられる。カルバモイルオキシ基としては、例えば４－ピペリジノピペリジン－１－カルボニルオキシ基、１－メチルピペリジン－４－カルボニルオキシ基等が挙げられる。環状アミノカルバモイルオキシ基としては、例えば１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－カルボニルオキシ基等が挙げられる。R^7で示されるアリール基上の置換基のうち、ハロゲン原子としては前記と同様の基が挙げられる。アルコキシ基としては前記と同様の基が挙げられる。アルキルアミノ基としては前記と同様の基が挙げられる。ジアルキルアミノ基としては前記と同様の基が挙げられる。アルキル基としては前記と同様の基が挙げられる。アリール基としては前記と同様の基が挙げられる。アルキルアミノアルキル基としては、C_{1}－$_{6}$アルキルアミノC_{1}－$_{6}$アルキル基、例えばジメチルアミノメチル基、モルホリノ－４－メチル基等が挙げられる。ヒドロキシアルキルオキシ基としては、例えば２－ヒドロキシエトキシ基、３－ヒドロキシプロポキシ基、２－ヒドロキシプロポキシ基等が挙げられる。R^7で示される環状アミノ基上の置換基のうち、アルキル基としては前記と同様の基が挙げられる。アルコキシカルボニル基としては前記と同様の基が挙げられる。アシル基としてはアセチル基、プロピオニル基、ベンゾイル基等が挙げられる。

[0020] 上記－ＣＯＯR^8におけるR^8は、炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、炭素数３～７の環状アルキル基又は環状アミノ基を示し、当該アルキル基にはアミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アリール基及びヘテロアリール基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはアルキル基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～２個が置換していてもよく、当該環状アルキル基にはカルボキシ

ル基及びアルコキシカルボニル基から選ばれる１～３個が置換していてもよい。ここで、炭素数１～６のアルキル基としては、前記と同じ基が挙げられ、炭素数１～４のアルキル基が好ましく、特にメチル基、エチル基、イソプロピル基、イソブチル基、ｔ－ブチル基が好ましい。炭素数６～１４のアリール基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、フェニル基が特に好ましい。ヘテロアリール基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、ピリジル基、インドリル基が特に好ましい。炭素数３～７の環状アルキル基としては前記R^7と同様の基が挙げられ、シクロペンチル基、シクロヘキシル基が特に好ましい。環状アミノ基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、Ｎ－メチルピペリジノ基、Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）ピペリジノ基、Ｎ－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジノ基が特に好ましい。R^8で示されるアルキル基上の置換基としては、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、環状アミノ基、カルボキシル基、アルコキシカルボニル基、アリール基又はヘテロアリール基が挙げられ、アルキルアミノ基としては、メチルアミノ基、エチルアミノ基が特に好ましい。ジアルキルアミノ基としては、ジメチルアミノ基、ジエチルアミノ基が特に好ましい。環状アミノ基としては、ピロリジノ基、ピペリジノ基が特に好ましい。アルコキシカルボニル基としては、メトキシカルボニル基、エトキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基が特に好ましい。アリール基としては、フェニル基、トリル基が特に好ましい。ヘテロアリール基としては、ピリジル基が特に好ましい。

[0021] 上記－SO_2R^9におけるR^9は、炭素数１～６のアルキル基、炭素数３～７の環状アルキル基、炭素数６～１４のアリール基又はヘテロアリール基を示す。当該アルキル基には１～３個のハロゲン原子が置換していてもよく、当該アリール基には１～３個の炭素数１～６のアルキル基が置換していてもよい。炭素数１～６のアルキル基としては、前記と同じ基が挙げられ、炭素数１～４のアルキル基、特にメチル基、エチル基、イソプロピル基、イソブチル基が好ましい。炭素数３～７の環状アルキル基としては、前記と同じ基が挙げられ、シクロプロピル基、シクロヘキシル基が好ましい。炭素数６～１４

OnCusp
Ex. 1038

のアリール基としては、前記と同じ基が挙げられ、特にフェニル基、トリル基が好ましい。ヘテロアリール基としては、前記と同じ基が挙げられ、チエニル基が好ましい。R^9で示されるアルキル基上の置換基としては、ハロゲン原子が挙げられ、ハロゲン原子としては、前記R^7と同様の基が挙げられる。R^9で示されるアリール基上の置換基としては、炭素数１～６のアルキル基が挙げられ、炭素数１～６のアルキル基としては、前記R^7と同様の基が挙げられる。

[0022] 上記の－ＣＯＮ$R^{10}R^{11}$におけるR^{10}とR^{11}は、同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、炭素数３～７の環状アルキル基又は炭素数１～７のアシル基を示すか、R^{10}とR^{11}が結合する窒素原子と一緒になって３～７員環の環状アミノ基を示し、当該アルキル基にはアリール基及び１～３個のヘテロアリール基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、炭素数１～７のアシル基には１～３個のハロゲン原子が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはさらに酸素原子、窒素原子又は硫黄原子が含まれてもよい。ここで、炭素数１～６のアルキル基としては、前記と同じ基が挙げられ、特にメチル基、エチル基、ヘキシル基が好ましい。炭素数６～１４のアリール基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、フェニル基が特に好ましい。ヘテロアリール基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、ピリジル基、インドリル基が特に好ましい。R^{10}及びR^{11}で示されるアルキル基上の置換基としてはアリール基、又はヘテロアリール基が挙げられ、アリール基としては前記R^7と同様の基が挙げられ、フェニル基が特に好ましい。ヘテロアリール基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、フリル基、チエニル基が特に好ましい。炭素数３～７の環状アルキル基としては、前記R^7と同じ基が挙げられ、シクロヘキシル基が特に好ましい。炭素数１～７のアシル基としては、例えばアセチル基が挙げられる。当該アシル基上に置換するハロゲン原子としては、上記R^7と同様の基が挙げられる。R^{10}及びR^{11}が、窒素原子と一緒になって形成する３～７員環の環状アミノ基としてはアジリジノ基、ピロリジノ基、ピペリジノ基が挙げ

OnCusp
Ex. 1038

られ、ピペリジノ基が特に好ましい。R^{10}及びR^{11}が窒素原子と一緒になって形成する３～７員環の環状アミノ基でさらに酸素原子、窒素原子又は硫黄原子を含む環状アミノ基としては、モルホリノ基、ピペラジノ基、Ｎ－メチルピペラジノ基、チオモルホリノ基、チオモルホリノ－１，１－ジオキシド基等が挙げられ、モルホリノ基、チオモルホリノ基が特に好ましい。

[0023] 上記の－ＣＳＮ$R^{12}R^{13}$におけるR^{12}とR^{13}は、同一又は異なって、水素原子、炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基又は炭素数３～７の環状アルキル基を示すか、R^{12}とR^{13}が結合する窒素原子と一緒になって３～７員環の環状アミノ基を示し、当該アルキル基にはアリール基、ヘテロアリール基、環状アミノ基、アミノ基、アルキルアミノ基、ジアルキルアミノ基、ヒドロキシ基及びアルキルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アルキル基には１～３個のヒドロキシ基が置換していてもよく、当該アリール基にはジアルキルアミノ基、アルキルオキシ基、アルキル基、シアノ基、ハロゲン原子、ヒドロキシアルキル基、ヒドロキシアルキルオキシ基、スルファモイル基及びヒドロキシ基から選ばれる１～３個が置換してもよく、当該ヘテロアリール基にはアルキル基、シアノ基、アリール基及びヒドロキシアルキル基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはさらに酸素原子、窒素原子又は硫黄原子が含まれてもよく、さらにはアルキル基、ヒドロキシ基、ハロゲン原子、アミノ基及びジアルキルアミノ基から選ばれる１～３個が置換していてもよい。ここで、炭素数１～６のアルキル基としては、前記と同じ基が挙げられ、炭素数１～４のアルキル基、特にメチル基、エチル基、イソブチル基が好ましい。炭素数６～１４のアリール基としては、前記R^{7}と同様の基が挙げられ、フェニル基が特に好ましい。ヘテロアリール基としては、前記R^{7}と同様の基が挙げられ、ピリジル基、インドリル基、ピリダジニル基、ピラジニル基、ベンゾチアジアゾリル基、チアゾリル基、イソオキサゾリル基、ピラゾリル基、トリアゾリル基が特に好ましい。R^{12}及びR^{13}で示されるアルキル基上の置換基としてはアリール基、ヘテロアリール基、環状アミノ基

OnCusp
Ex. 1038

、アミノ基、ジアルキルアミノ基、ヒドロキシ基及びアルキルオキシ基が挙げられ、アリール基としては前記R^7と同様の基が挙げられ、フェニル基が特に好ましい。ヘテロアリール基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、フリル基、チエニル基が特に好ましい。環状アミノ基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、モルホリノ基が好ましい。アルキルアミノ基としては、前記R^7と同様の基が挙げられる。ジアルキルアミノ基としては、前記R^7と同様の基が挙げられる。アルキルオキシ基としては、前記R^7と同様の基が挙げられ、特にメトキシ基が好ましい。炭素数３～７の環状アルキル基としては、前記R^7と同じ基が挙げられ、シクロヘキシル基が特に好ましい。R^{12}及びR^{13}が、窒素原子と一緒になって形成する３～７員環の環状アミノ基としてはアジリジノ基、ピロリジノ基、ピペリジノ基、アゼパノ基等が挙げられ、アジリジノ基、ピロリジノ基、ピペリジノ基が特に好ましい。R^{12}及びR^{13}が窒素原子と一緒になって形成する３～７員環の環状アミノ基でさらに酸素原子、窒素原子又は硫黄原子を含む環状アミノ基としては、モルホリノ基、ピペラジノ基、Ｎ－メチルピペラジノ基、チオモルホリノ基、チオモルホリノ－１，１－ジオキシド基等が挙げられ、モルホリノ基、チオモルホリノ基が特に好ましい。当該環状アミノ基上に置換するアルキル基としては、前記R^7と同じ基が挙げられ、メチル基が特に好ましい。当該環状アミノ基上に置換するハロゲン原子としては、前記R^7と同じ基が挙げられ、フッ素が特に好ましい。当該環状アミノ基上に置換するアシル基としては、前記R^7と同じ基が挙げられる。当該環状アミノ基上に置換するジアルキルアミノ基としては、前記R^7と同じ基が挙げられる。当該ヘテロアリール基上に置換するアルキル基としてはメチル基、エチル基等が挙げられ、アリール基としてはフェニル基等が挙げられ、ヒドロキシアルキル基としては２－ヒドロキシエチル基、３－ヒドロキシプロピル基、２－ヒドロキシプロピル基等が挙げられる。

[0024] R^5及びR^6が、窒素原子と一緒になって形成する３～７員の環状アミノ基としては、アジリジノ基、ピロリジノ基、ピペリジノ基等が挙げられる。

[0025] R^5及びR^6は、水素原子及び炭素数１～６のアルキル基、アリールアルキル

基、炭素数２～６のアルケニル基を示す場合は、同一でも異なっていてもよく、R^5又はR^6の一方が－ＣＯＲ^7、－ＣＯＯＲ^8、－ＳＯ$_2$Ｒ^9、－ＣＯＮＲ^{10}Ｒ^{11}又は－ＣＳＮＲ^{12}Ｒ^{13}を示す場合には、他方は水素原子であるのが好ましい。

[0026] R^5及びR^6の好ましい組み合せについて説明する。以下の（１）～（３）の組み合せが特に好ましい。

（１）R^5及びR^6が水素原子の場合。

（２）R^5が水素原子であり、R^6が－ＣＯＲ^7、－ＣＯＯＲ^8、－ＳＯ$_2$Ｒ^9、－ＣＯＮＲ^{10}Ｒ^{11}又は－ＣＳＮＲ^{12}Ｒ^{13}である場合。

（３）R^5が－ＣＯＲ^{7}で、R^6が－ＣＯＯＲ^{8}の場合。

[0027] 上記（２）のうち、R^6は－ＣＯＲ^7、－ＣＯＯＲ^8、－ＳＯ$_2$Ｒ^{9}又は－ＣＳＮＲ^{12}Ｒ^{13}がさらに好ましい。

R^6が－ＣＯＲ^{7}の場合、R^7は水素原子；炭素数２～６のアルキル基；炭素数３～７の環状アルキル基；Ｃ$_{3-7}$環状アルキル基、ハロゲン原子、アミノ基、Ｃ$_{1-6}$アルキルアミノ基、Ｃ$_{6-14}$アリールアルキルアミノ基、ジ（Ｃ$_{1-6}$アルキル）アミノ基、環状アミノ基、Ｃ$_{1-6}$アルコキシカルボニルアミノ基、Ｃ$_{6-14}$アリールアミノ基、ヘテロアリールアミノ基、カルボキシル基、Ｃ$_{1-6}$アルコキシカルボニル基、ヒドロキシ基、アシルオキシ基、ジ（Ｃ$_{1-6}$アルキル）アミノアシルオキシ基、Ｃ$_{1-6}$アルキルオキシ基、Ｃ$_{6-14}$アリール基、Ｃ$_{6-14}$アリールオキシ基、Ｃ$_{6-14}$アリールアルキルオキシ基、ヘテロアリール基、ヘテロアリールオキシ基、チオール基、アシルチオ基、ジ（Ｃ$_{1-6}$アルキル）アミノアシルチオ基、Ｃ$_{1-6}$アルキルチオ基、Ｃ$_{1-6}$アルキルスルホニル基、Ｃ$_{6-14}$アリールチオ基及びヘテロアリールチオ基から選ばれる１～３個が置換した炭素数１～６のアルキル基；あるいはハロゲン原子、Ｃ$_{1-6}$アルコキシ基、ニトロ基、シアノ基、アミノ基、Ｃ$_{1-6}$アルキルアミノ基、ジ（Ｃ$_{1-6}$アルキル）アミノ基、Ｃ$_{1-6}$アルキル基、Ｃ$_{6-14}$アリール基及びＣ$_{1-6}$アルキルアミノアルキル基から選ばれる１～３個が置換していてもよいＣ$_{6-14}$アリール基又はヘテロアリール基が好ましい。

[0028] R^6が－ＣＯＯＲ^{8}の場合、R^8は炭素数１～６のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、ヘテロアリール基、炭素数３～７の環状アルキル基又は環状

アミノ基が好ましく、当該アルキル基にはアミノ基、C_{1-6}アルキルアミノ基、ジ（C_{1-6}アルキル）アミノ基、環状アミノ基、カルボキシル基、C_{1-6}アルコキシカルボニル基、C_{6-14}アリール基及びヘテロアリール基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基にはC_{1-6}アルキル基又はC_{1-6}アルコキシカルボニル基が置換していてもよく、当該環状アルキル基にはカルボキシル基、アルコキシカルボニル基が置換していてもよい。

[0029] R^6が－SO_2R^9の場合、R^9はC_{6-14}アリール基又はヘテロアリール基が好ましい。R^6が－$CSNR^{12}R^{13}$の場合、R^{12}とR^{13}は同一又は異なって、水素原子、炭素数１～４のアルキル基、炭素数５～６の環状アルキル基、アリール基、ヘテロアリール基又はR^{12}とR^{13}が窒素原子と一緒になって形成する４～６員環の環状アミノ基が好ましく、当該アルキル基にはアルキルオキシ基、ヒドロキシ基が置換していてもよく、当該アリール基にはジアルキルアミノ基、アルキルオキシ基、アルキル基、シアノ基、ハロゲン原子、ヒドロキシアルキル基及びヒドロキシアキルオキシ基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該ヘテロアリール基にはアルキル基、シアノ基、アリール基、ヒドロキシアルキル基から選ばれる１～３個が置換していてもよく、当該環状アミノ基には酸素原子、硫黄原子が含まれていてもよく、さらにはアルキル基、ハロゲン原子から選ばれる１～３個が置換していてもよい。ただし、R^5が水素原子であり、R^6がアセチル基の場合、R^1は塩素原子、臭素原子又はヨウ素原子ではない。

[0030] 本発明において、下記から選ばれるコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物が好ましい。

４－ニトロコルヒチン、

４－ヒドロキシコルヒチン、

４－フルオロコルヒチン、

４－アミノコルヒチン、

４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－フルオロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－ホルミルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（クロロアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）コルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

[0031] ４－クロロ－Ｎ，Ｎ－ジメチルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ，Ｎ－ジエチルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－７－（ピペラジン－１－イル）－７－デ（アセチルアミノ）コルヒチン、

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－クロロ－Ｎ－メチルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－クロロ－Ｎ－エチルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－アリル－４－クロロ－Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－クロロ－Ｎ－（２－メチルアリル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－ベンジル－Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－メチルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－エチルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－アリル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－メチルアリル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－ベンジル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－プロピルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－イソブチル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（アセトキシアセチル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ヒドロキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペラジン－４－イルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－イルオキシカルボニル］デアセチルコルヒチン、

[0032] ４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－４－イルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［ｔｒａｎｓ－１－（ベンジルオキシカルボニル）シクロヘキサン－４－イルオキシカルボニル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（チオモルホリン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１，１－ジオキソチオモルホリン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペラジン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－ブチリル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－イソブチリルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロプロパンカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－イソバレリルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－ヘプタノイルデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロヘキサンカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－ベンゾイル－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェニルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－３－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－４－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－２－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（トリフルオロアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メトキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェノキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（メチルチオ）アセチル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－ピリジルチオ）アセチル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（４－ブロモブチリル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３，５－ジフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３，４，５－トリフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

[0033] ４－クロロ－Ｎ－（３，４，５－トリメトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（フェニルチオ）アセチル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（ジメチルアミノ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２，４－ジフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－３－イルオキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－２－イルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－３－イルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（エトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソプロピルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソブチルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェノキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルオキシカルボニル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（エタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

[0034] ４－クロロ－Ｎ－（イソプロパンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロプロパンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソブタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンゼンスルホニル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｐ－トルエンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－チオフェンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（トリフルオロメタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（エチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソプロピルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ヘキシルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェニルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルカルバモイル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジメチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジエチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（モルフォリン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピロリジン－１－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－１－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（トリクロロアセチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジメチルアミノアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジエチルアミノアセチル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニルアミノアセチル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

[0035] ４－クロロ－Ｎ－（アミノアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピロリジン－１－イルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－１－イルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－カルボキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（メトキシカルボニル）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－カルボキシブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（メトキシカルボニル）ブチリル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ｔｒａｎｓ－１－カルボキシシクロヘキサン－４－イルオキシカルボニル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピリジン－３－イルオキシカルボニル）デアセチルコ

ルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ジメチルアミノ）プロピル－３－イルオキシカルボニル］デアセチルコルヒチン、

[0036] ４－クロロ－Ｎ－［３－（ピロリジン－１－イル）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（４－モルホリニルメチル）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジエチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピロリジン－１－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－１－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（モルホリン－４－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（チオモルホリン－４－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１，１－ジオキソチオモルホリン－４－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペラジン－４－チオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

（Ｓ）－４－クロロ－Ｎ－（２－アセトキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

（Ｓ）－４－クロロ－Ｎ－（２－ヒドロキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

（Ｒ）－４－クロロ－Ｎ－（２－アセトキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

（Ｒ）－４－クロロ－Ｎ－（２－ヒドロキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

OnCusp
Ex. 1038

４－クロロ－Ｎ－（２－ヒドロキシ－２－メチルプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ヒドロキシ－２，２－ジメチルプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［２，２－ビス（ヒドロキシメチル）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－アセチルピペリジン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－ベンゾイルピペリジン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ｔｅｒｔ－ブチルオキシカルボニル）ピペリジン－４－カルボニル］デアセチルコルヒチン、

[0037] ４－クロロ－Ｎ－（ピペリジン－４－カルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノメチル）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（トリフェニルメチルオキシ）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ヒドロキシプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メタンスルホニルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジエチルアミノ）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ピペリジノプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［Ｎ’－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）－Ｎ’－メチルアミノアセ

チル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［Ｎ’－ベンジル－Ｎ’－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）アミノアセチル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペリジン－４－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－イルカルボニル］デアセチルコルヒチン、

[0038] ４－クロロ－Ｎ－（Ｎ’－メチルアミノアセチル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（Ｎ’－ベンジルアミノアセチル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（ジメチルアミノ）ブチリル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルチオカルバモイル）－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロヘキシルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－ピペリジノエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［２－（４－モルフォリノ）エチル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－ピリジルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［ｐ－（ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

OnCusp
Ex. 1038

[0039] ４－クロロ－Ｎ－（４－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（２－ナフトイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（２－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（４－メチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（４－フェニルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３，５－ジニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３，５－ジメチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３，５－ジメトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（２，４－ジメトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（２，４，６－トリメチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（４－シアノベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３－ヒドロキシ－３－メチルブチリル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－［４－（ベンジルオキシ）ブチリル］デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（２－シアノベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３－シアノベンゾイル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（２－エチル－２－ヒドロキシブチリル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（１－ヒドロキシシクロプロパンカルボニル）デアセチルコルヒチン、
４－クロロ－Ｎ－（３－フェニルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－ヒドロキシブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）コルヒチン、

[0040] ４－ブロモ－Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（シクロヘキサンカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－ベンゾイルデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（フェニルアセチル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－アリル－４－ブロモ－Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（トリフルオロアセチル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（アセトキシアセチル）－４－ブロモデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－ピリジンカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－アリル－４－ブロモデアセチルコルヒチン、

[0041] Ｎ－（ベンジルオキシカルボニル）－４－ブロモデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－[（メチルチオ）アセチル]デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノ）アセチル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－プロピルデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ヘキシルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（フェニルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ヒドロキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（イソブタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－トシルデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－チオフェンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２，４－ジフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

OnCusp
Ex. 1038

４－ブロモ－Ｎ－［３－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（エチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（フェニルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

[0042] ４－ブロモ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジエチルカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ピペリジン－１－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３－ヒドロキシ－２，２－ジメチルプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－ヒドロキシ－２－メチルプロピオニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（２－エチル－２－ヒドロキシブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（１－ヒドロキシシクロプロパンカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［２，２－ビス（ヒドロキシメチル）プロピオニル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３－ヒドロキシ－３－メチルブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［４－（ベンジルオキシ）ブチリル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（４－シアノベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（３，５－ジメチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（４－メチルベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－[３－（ピロリジン－１－イル）ベンゾイル]デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（イソブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ベンジルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［４－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

[0043] ４－ブロモ－Ｎ－（ピリジン－３－イルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジエチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ピロリジン－１－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ピペリジン－１－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（４－ヒドロキシブチリル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（チオモルホリン－４－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（１，１－ジオキソチオモルホリン－４－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（４－メチルピペラジン－１－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（モルホリン－４－イルチオカルボニル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（エタンスルホニル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－２，３－ジデメチルコルヒチン、

４－クロロ－２，３－（メチレンジオキシ）－２，３－ジデメトキシコル

OnCusp
Ex. 1038

ヒチン、

４－クロロ－２，３－（エチレンジオキシ）－２，３－ジデメトキシコルヒチン、

４－クロロ－１，２－（メチレンジオキシ）－１，２－ジデメトキシコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（エチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（フェニルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（４－ピペリジノピペリジン－１－カルボキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（１－メチルピペラジン－４－カルボキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ジメチルアミノアセトキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）プロピオニルオキシアセチル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－カルボキシアセチル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（チオアセトキシアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メルカプトアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－（エトキシカルボニル）ピペリジン－４－イルカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－（フルオロメチル）コルヒチン、

４－（ジフルオロメチル）コルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジプロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［Ｎ’－エチル－Ｎ’－プロピルチオカルバモイル］デ

OnCusp
Ex. 1038

アセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－ヒドロキシピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－メチルピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛Ｎ’－［２－（ジメチルアミノ）エチル］－Ｎ’－メチルチオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［４－（ジメチルアミノ）ピペリジン－１－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（Ｎ’－エチル－Ｎ’－メチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［１－アセチルピペラジン－４－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［Ｎ’－（２－ヒドロキシエチル）－Ｎ’－メチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［Ｎ’－（３－ヒドロキシプロピル）－Ｎ’－メチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［Ｎ’，Ｎ’－ビス（２－ヒドロキシエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３－ヒドロキシプロピル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４，４－ジフルオロピペリジン－１－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［（アゼチジン－１－イル）チオカルバモイル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（インダゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ｃｉｓ－２，６－ジメチルモルホリン－４－イル）

チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（２－トリルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（３－トリルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（２－ヒドロキシエチル）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエチル）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－シアノフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［２，１，３－ベンゾチアジアゾール－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－メトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３－メトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３－シアノフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３，４－ジメトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－クロロフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３－クロロフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－クロロフェニル）チオカルバモイル］デアセチ

OnCusp
Ex. 1038

ルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－シアノフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（チアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（チオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（メチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｎ－プロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｎ－ブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｔｅｒｔ－ブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロペンチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（イソプロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（ｎ－ヘキシルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ｔｒａｎｓ－４－ヒドロキシシクロヘキシル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［２－（ジメチルアミノ）エチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－ヒドロキシエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－メトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ｐ－トルイル）チオカルバモイル］デアセチルコル

OnCusp
Ex. 1038

ヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロプロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（アリルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１－メチルピペリジン－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－（シクロヘプチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２－メトキシエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（２，２，２－トリフルオロエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（インダン－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－スルファモイルフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３，５－ジメチルイソオキサゾール－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－ヒドロキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（５－メチルピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（プロピルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（ブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（２，２，２－トリフルオロエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（シクロペンチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

OnCusp
Ex. 1038

４－ブロモ－Ｎ－（シクロヘキシルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－メトキシフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－｛［２－（４－モルホリノ）エチル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（Ｎ’，Ｎ’－ジメチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（Ｎ’－エチル－Ｎ’－メチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－メチルピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４，４－ジフルオロ－ピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（５－メチルイソオキサゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（５－メチル－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（イソオキサゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（３，４－ジメチルイソオキサゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－シアノピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（５－フェニルピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

OnCusp
Ex. 1038

Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－ヨードコルヒチン、

Ｎ－（ｔ－ブチルオキシカルボニル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－シクロプロピルカルボニル－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（トリフルオロアセチル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－エチルスルホニル－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［３－（ジメチルアミノ）ベンゾイル］－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（４－メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（４－ニトロベンゾイル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－（３，５－ジフルオロベンゾイル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（３－シアノベンゾイル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（アセトキシアセチル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（フェニルアセチル）デアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－プロピルデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ヒドロキシアセチル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［１－（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン－４－イルカルボニル］－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－（ピリジン－４－イルカルボニル）デアセチルコルヒチン、

Ｎ－フェニルスルホニル－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（シクロヘキシルチオカルバモイル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［４－（ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル］－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

Ｎ－（ベンジルカルバモイル）－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－［（ピペリジン－１－イル）カルボニル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－エチル－４－ヨードデアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－［（ピペリジン－１－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

４－ヨード－Ｎ－［（チオモルホリン－４－イル）チオカルボニル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［（ベンゾイミダゾール－２－イル）チオカルバモイル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

Ｎ－［（ベンゾチアゾール－２－イル）チオカルバモイル］－４－クロロデアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリミジン－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリダジン－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリジン－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１－メチルピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４－メチルチアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（４，５－ジメチルチアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリジン－４－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエトキシ）ベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエトキシ）－４－メトキシベンゾイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピラジン－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１，３，４－チアジアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（ピリミジン－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１，２－ジメチルイミダゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）－２－メチルイミダゾール－５－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピラゾール－５－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピラゾール－３－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（５－メチル－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（１－メチル－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－シアノピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（５－メチルピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（１－メチルピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（ピラゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（３，４－ジメチルイソオキサゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（５－メチルイソオキサゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－メチルチアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（チアゾール－２－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエチル）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（ピリダジン－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

Ｎ－［（アゼチジン－１－イル）チオカルボニル］－４－ブロモデアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（メチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－（チオカルバモイル）デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）－１，２，４－トリアゾール－３－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）ピラゾール－３－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［４－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［３－（２－ヒドロキシエトキシ）フェニルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（４－シアノフェニル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［（２－ヒドロキシエチル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［Ｎ’－（２－ヒドロキシエチル）－Ｎ’－メチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－ブロモ－Ｎ－［Ｎ’－（３－ヒドロキシプロピル）－Ｎ’－メチルチオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１－メチル－１，２，４－トリアゾール－３－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－［（１－メチル－１，２，４－トリアゾール－５－イル）チオカルバモイル］デアセチルコルヒチン、

４－クロロ－Ｎ－｛［１－（２－ヒドロキシエチル）－１，２，４－トリアゾール－３－イル］チオカルバモイル｝デアセチルコルヒチン。

[0044] 本発明のコルヒチン誘導体の塩としては、有機酸塩及び無機酸塩が挙げられる。有機酸塩を形成する酸としては、酢酸、プロピオン酸、乳酸、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、フマル酸、マレイン酸、メシル酸等が挙げられる。無機酸塩を形成する無機酸としては、塩酸、硝酸、硫酸、リン酸、臭化水素酸等が挙げられる。

[0045] 本発明のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物は、７位が不斉炭素原子であることから、光学活性体である。また、この位置以外に不斉炭素原子がある場合は、その炭素原子に基づく光学異性体が存在し得る。本発明は、これらの光学異性体を全て含むものである。さらに、本発明化合物は、水和物等の溶媒和物の形態である場合も含まれる。

OnCusp
Ex. 1038

[0046] 本発明のコルヒチン誘導体の溶媒和物としては、水和物、エタノール溶媒和物等が挙げられる。

[0047] 本発明のコルヒチン誘導体（１）は、コルヒチン化合物の４位にハロゲン原子、ヒドロキシ基、ニトロ基、アミノ基又はモノー、ジー若しくはトリーフルオロメチル基を導入することにより製造することができる。例えばハロゲン原子の導入は、コルヒチン化合物に、Ｎ－フルオロベンゼンスルホンイミド、Ｎ－クロロコハク酸イミド、Ｎ－ブロモコハク酸イミド、Ｎ－ヨードコハク酸イミド等のハロゲン化試薬を反応させることにより行われる。当該ハロゲン化反応は、酢酸、アセトニトリル、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド等の溶媒を用いて、０～１５０℃で１～５０時間行えばよい。

[0048] ニトロ基の導入は、コルヒチン化合物に、硝酸二アンモニウムセリウム－トリフルオロ酢酸無水物、硝酸、混酸、硝酸アセチル、ニトロニウム塩等のニトロ化試薬を反応させることにより行われる。この反応は、ジクロロメタン、クロロホルム、１，２－ジクロロエタン、四塩化炭素等のハロゲン化炭化水素系溶媒、酢酸、ニトロメタン、ニトロエタン等の溶媒中、－７８～１５０℃で１～５０時間行えばよい。

[0049] ヒドロキシ基の導入は、コルヒチン化合物の４位にホルミル基を導入し、次いで酸化することにより行うことができる。まず、ホルミル基の導入は、コルヒチン化合物に、塩化スズ、塩化アルミニウム等のルイス酸とジクロロメチルメチルエーテル等を反応させることにより行われる。次いで、当該ホルミル基の酸化反応は、例えば、モノペルオキシフタル酸　マグネシウム等を反応させることにより行うことができる。

[0050] アミノ基の導入は、４－ニトロコルヒチンを接触還元等により還元するか、又はコルヒチンの４位にカルボキシル基を導入し、次いでこのカルボキシル基をアミノ基に変換すればよい。まず、カルボキシル基の導入反応は、４－ホルミルコルヒチン化合物を酸化することにより行うことができ、例えば亜塩素酸ナトリウム、Ｊｏｎｅｓ試薬、過マンガン酸塩、酸化銀等を反応させればよい。カルボキシル基のアミノ基への変換には、カルボン酸を直接ト

OnCusp
Ex. 1038

リエチルアミンとジフェニルリン酸アジドと反応させるか、カルボン酸を酸塩化物又は酸ヒドラジドとしアジ化ナトリウム又は亜硝酸誘導体等を反応させればよい。

[0051] モノー、ジー若しくはトリーフルオロメチル基の導入は、モノフルオロメチル基の場合、コルヒチン化合物の４位にホルミル基を導入し、次いで還元により４位をヒドロキシメチル基とした後、ヒドロキシ部分をフッ素化することにより行うことができる。ジフルオロメチル基の場合、４位のホルミル基をジチオアセターールへと変換した後、フッ素化することにより行うことができる。フッ素化試薬としては、例えばフッ化水素－ピリジン錯体、（ジエチルアミノ）サルファ―トリフルオリド等を用いればよい。

[0052] 本発明のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物は、後記実施例に示すように、ｉｎ ｖｉｔｒｏ及びｉｎ ｖｉｖｏにおいて優れた癌細胞増殖阻害活性を示す。また、毒性も低い。従って、本発明のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物は、ヒトを含む哺乳類の抗癌剤として有用である。

[0053] 本発明のコルヒチン誘導体、その塩又はそれらの溶媒和物を医薬として用いる場合、本発明の化合物は、そのままでも投与することができるが、他の薬学的に許容される担体、例えば分散補助剤、賦形剤等の担体と混合し、粉剤、液剤、カプセル剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、エリキシル剤、顆粒剤、丸剤、錠剤、トロ―チ剤、リモネ―デ剤等の経口剤又は注射剤等の剤形で使用することができる。これらの製剤は、公知の方法で製造することができる。

[0054] 担体としては、例えば、マンニトール、乳糖、デキストラン等の水溶性の単糖類ないしオリゴ糖類もしくは多糖類；例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、メチルセルロース等のゲル形成性又は水溶性のセルロース類；例えば、結晶性セルロース、αーセルロース、架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム、及びそれらの誘導体等の水吸収性でかつ水難溶性のセルロース類；例えば、ヒドロキシプロピル澱

OnCusp
Ex. 1038

粉、カルボキシメチル澱粉、架橋澱粉、アミロース、アミロペクチン、ペクチン及びそれらの誘導体等の水吸収性でかつ水難溶性の多糖類；例えば、アラビアガム、トラガントガム、グリコマンナン及びそれらの誘導体等の水吸収性でかつ水難溶性のガム類；例えば、ポリビニルピロリドン、架橋ポリアクリル酸及びその塩、架橋ポリビニルアルコール、ポリヒドロキシエチルメタクリレート及びそれらの誘導体等の架橋ビニル重合体類；リン脂質、コレステロール等のリポソーム等分子集合体を形成する脂質類等を挙げることができる。

[0055] 本発明の化合物の溶解性が低い場合には、可溶化処理を施すことができる。可溶化処理としては通常医薬に適用できる方法、例えば、ポリオキシエチレンアルコールエーテル類、ポリオキシエチレンアシルエステル類、ソルビタンアシルエステル類やポリオキシエチレンソルビタンアシルエステル類等の界面活性剤を添加する方法、ポリエチレングリコール等の水溶性高分子を使用する方法等が挙げられる。また、必要により、可溶性の塩にする方法、シクロデキストリン等を用いて包接化合物を形成させる方法等も使用できる。

[0056] 本発明の抗癌剤の対象となる癌種としては、頭頸部癌、食道癌、胃癌、結腸癌、直腸癌、肝臓癌、胆嚢・胆管癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、腎癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣腫瘍、骨・軟部肉腫、白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、皮膚癌、脳腫瘍等が挙げられる。

[0057] 本発明の医薬の投与量は、投与法や患者の症状等に合わせて適宜調整すればよいが、成人１日あたり１ｍｇ～１０ｇ、さらに１００ｍｇ～１０ｇ、特に５００ｍｇ～１０ｇ投与するのが好ましい。

実施例

[0058] 次に本発明を実施例を挙げてさらに詳細に説明するが、これは単に例示であって本発明を限定するものではない。

[0059] 参考例１

４－ホルミルコルヒチンの合成

OnCusp
Ex. 1038

コルヒチン100 mg （0.25 mmol）をジクロロメタン 2.5 mLに溶解し、氷冷下塩化スズ（IV）87.8μL （0.75 mmol, 3 eq）、ジクロロメチルメチルエーテル0.3 mL （3.0 mmol, 12 eq）を順に滴下し、0℃、アルゴン雰囲気下で30分攪拌した後、室温まで昇温しさらに12.5時間攪拌した。反応液に氷、クロロホルムを加え1時間攪拌し、分液漏斗にあけて有機層を分取した後、10%水酸化ナトリウム次いで水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（10%→ 15%→ 20%メタノール/ 酢酸エチル）にて精製し、表題の化合物134.4 mg（収率 定量的）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：10.46 (1H, s, -CHO), 7.55 (1H, br-d, J=6.6Hz, -NH), 7.52 (1H, s, H-8), 7.23 (1H, d, J=10.8Hz, H-12), 6.85 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.54 (1H, ddd, J=12.3, 6.2, 6.2Hz, H-7), 4.06 (3H, s, -OMe), 4.02 (3H, s, -OMe), 3.98 (3H, s, -OMe), 3.87 (1H, dd, J=13.3, 4.7Hz, H-5β), 3.69 (3H, s, -OMe),2.34 (1H, dddd, J=12.7, 12.7, 6.4, 6.4Hz, H-6β), 2.01 (3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$), 2.00 (1H, ddd, J=13.2, 13.2, 6.7Hz, H-5α), 1.81 (1H, ddd, J=12.2, 12.2, 4.9Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%)：427 (M^+, 50.0), 340(100.0).

[0060] 実施例１

４－ニトロコルヒチンの合成

硝酸二アンモニウムセリウム（IV）（CAN）14.3 mg（0.026 mmol, 1.05 eq）をジクロロメタン0.5 mLに溶解し、コルヒチン10 mg （0.025 mmol）、トリフルオロ酢酸無水物12.2 μL （0.0875 mmol, 3.5 eq）を加え、室温で16時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、クロロホルムで4回抽出し、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（10%メタノール/ 酢酸エチル及び5%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物1.6 mg（収率 15%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.47 (1H, s, H-8), 7.25 (1H, d, J=11.0H

OnCusp
Ex. 1038

z, H-12),7.10 (1H, br-d, J=6.7Hz, -NH), 6.84 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.61 (1H, ddd, J=12.1, 6.1, 6.1Hz, H-7), 4.04 (3H, s, -OMe), 4.03 (3H, s, -OMe), 4.01 (3H, s, -OMe), 3.68 (3H, s, -OMe), 2.56 (1H, dd, J=13.6, 5.0Hz, H-5β), 2.34 (1H, dddd, J=12.8, 12.8, 6.4, 6.4Hz, H-6β), 2.33 (1H, ddd, J=13.3, 13.3, 6.6Hz, H-5α), 2.02 (3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$), 1.83 (1H, ddd, J=12.0, 12.0, 6.0Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%) : 444 (M^+, 35.5), 57(100.0)

[0061] 実施例２

４－ヒドロキシコルヒチンの合成

４－ホルミルコルヒチン15.7 mg (0.037 mmol) をメタノール0.37 mLに溶解し、80%モノペルオキシフタル酸　マグネシウム (MMPP) 22.3 mg (0.036 mmol, 3 eq) を加え、室温で4時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えクエンチし、1N塩酸で酸性とし、クロロホルムで4回抽出した。有機層を分取し、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法 (3%メタノール/ クロロホルム) にて精製し、表題の化合物5.7 mg (収率 37%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] : 7.46 (1H, s, H-8), 7.32 (1H, d, J=10.6Hz, H-12),6.86 (1H, br-d, J=8.4Hz, -NH), 6.83 (1H, d, J=11.2Hz, H-11), 5.68 (1H, br-s, -OH), 4.63 (1H, ddd, J=12.3, 6.3, 6.3Hz, H-7), 4.02 (3H, s, -OMe), 4.00 (3H, s, -OMe), 3.99 (3H, s, -OMe), 3.58 (3H, s, -OMe), 3.15 (1H, dd, J=13.7, 5.9Hz, H-5β),2.25 (1H, dddd, J=12.6, 12.6, 6.3, 6.3Hz, H-6β), 2.00 (3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$), 1.97(1H, ddd, J=13.4, 13.4, 6.6Hz, H-5α), 1.78 (1H, ddd, J=11.9, 11.9, 5.9Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%) : 415 (M^+, 100.0), 328 (55.8), 313 (65.5).

[0062] 参考例２

コルヒチン－４－カルボン酸の合成

４－ホルミルコルヒチン170 mg (0.4 mmol) をt-ブタノール2.0 mLと水1.0

mLの混液に溶解し、氷冷下２－メチル－２－ブテン（2Mテトラヒドロフラン溶液）3 mL（6.0 mmol，15 eq）、亜塩素酸ナトリウム181 mg（2.0 mmol，5 eq）、リン酸二水素ナトリウム480 mg（4.0 mmol，10 eq）を順に加え、室温で3時間撹拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加えてクエンチし、10%メタノール/ クロロホルムで4回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、$MgSO_4$乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（10% [10% 酢酸含有メタノール] / クロロホルム）にて精製し、表題の化合物174.6 mg（収率 99%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.65（1H, s, H-8），7.44（1H, br-s, -NH），7.32（1H, d, J=10.8Hz, H-12），6.92（1H, d, J=11.0Hz, H-11），4.64（1H, ddd, J=12.2, 6.3,6.3Hz, H-7），4.03（3H, s, -OMe），3.99（3H, s, -OMe），3.96（3H, s, -OMe），3.65（3H, s, -OMe），2.81（1H, dd, J=13.7, 4.6Hz, H-5β），2.33（1H, dddd, J=12.4, 12.4,6.2, 6.2Hz, H-6β），2.18（1H, ddd, J=13.1, 13.1, 6.2Hz, H-5α），1.99（3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$），1.81（1H, ddd, J=11.6, 11.6, 5.6Hz, H-6α）.

EI-MS m/z（%）：443（M^+, 44.7），370（80.0），338（100.0）.

[0063] 実施例３

４－フルオロコルヒチンの合成

コルヒチン30 mg（0.075 mmol）をギ酸0.75 mLに溶解し、N-フルオロベンゼンスルホンイミド（NFSi）47.3 mg（0.15 mmol，2 eq）を加えて、アルゴン雰囲気下70℃にて12時間攪拌した。その後、NFSi 47.3 mg（0.15 mmol，2 eq)を加えて6.5時間撹拌した。さらにNFSi 47.3 mg（0.15 mmol，2 eq)、ギ酸0.5 mLを追加し、6.5時間撹拌した。室温まで放冷し、反応液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて数分間攪拌した後、水酸化ナトリウムを加えて塩基性にした。クロロホルムで4回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（10% → 15%メタノール/ 酢酸エチル）にて精製し、表題の化合物4.5 mg（収率 15%）を得た。

OnCusp
Ex. 1038

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] : 7.48 (1H, H-8), 7.31 (1H, d, J=10.6 Hz, H-12), 7.04 (1H, br-d, J=4.8Hz, -NH), 6.84 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.61(1H, ddd, J=12.2, 6.2, 6.2Hz, H-7), 4.01 (6H, s, -OMe), 4.00 (3H, s, -OMe), 3.61 (3H, s, -OMe), 3.07 (1H, dd, J=13.9, 6.0Hz, H-5β), 2.27 (1H, dddd, J=12.6, 12.6, 6.3, 6.3Hz, H-6β), 2.04 (1H, overlapped, H-5α), 2.00 (3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$), 1.84(1H, ddd, J=12.2, 12.2, 6.6Hz, H-6α).

FAB-MS (NBA) m/z : 417 $[M+H]^+$.

[0064] 参考例３

４－クロロコルヒチンの合成

コルヒチン200 mg（0.5 mmol）を酢酸0.25 mLに溶解し、N-クロロコハク酸イミド（NCS）133.5 mg（1.0 mmol, 2 eq）を加えて、アルゴン雰囲気下70℃にて3時間攪拌した。室温まで放冷し、反応液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて数分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした。クロロホルムで4回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（10%メタノール/酢酸エチル）にて精製し、表題の化合物177.2 mg（収率 82%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] : 7.60 (1H, br-d, J=5.9Hz, -NH), 7.54 (1H, s, H-8), 7.30 (1H, d, J=10.6Hz, H-12), 6.86 (1H, d, J=11.0Hz, H-11), 4.55 (1H, ddd, J=12.3, 6.3, 6.3Hz, H-7), 4.02 (3H, s, -OMe), 4.00 (3H, s, -OMe), 3.97 (3H, s, -OMe), 3.63 (3H, s, -OMe), 3.26(1H, dd, J=13.5, 4.9Hz, H-5β), 2.30 (1H, dddd, J=12.7, 12.7, 6.3, 6.3Hz, H-6β), 2.16 (1H, ddd, J=13.4, 13.4, 6.3Hz, H-5α), 2.00 (3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$), 1.85 (1H, ddd, J=12.3, 12.3, 5.6Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%) : 433 (M^+, 18.5), 435 ($[M+2]^+$, 6.7), 91 (100.0).

[0065] 参考例４

４－ブロモコルヒチンの合成

OnCusp
Ex. 1038

コルヒチン10 mg（0.025 mmol）を酢酸0.25 mLに溶解し、N-ブロモコハク酸イミド（NBS）6.7 mg（0.05 mmol，2 eq）を加えて、アルゴン雰囲気下70℃にて13時間攪拌した。室温まで放冷し、反応液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて数分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした。クロロホルムで4回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（5% → 10%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物3.4 mg（収率 29%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.99（1H, br-s, -NH), 7.58（1H, s, H-8), 7.29（1H, d, J=10.6Hz, H-12), 6.87（1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.52（1H, ddd, J=12.2, 6.2,6.2Hz, H-7), 4.02（3H, s, -OMe), 3.98（3H, s, -OMe), 3.95（3H, s, -OMe), 3.62（3H, s, -OMe), 3.25（1H, dd, J=13.4, 5.2Hz, H-5β), 2.31（1H, dddd, J=12.6, 12.6,6.3, 6.3Hz, H-6β), 2.24（1H, ddd, J=13.4, 13.4, 6.1Hz, H-5α), 1.85（3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$), 1.74（1H, ddd, J=11.9, 11.9, 5.8Hz, H-6α).

EI-MS m/z（%）：477（M^+, 4.3), 479（$[M+2]^+$).

[0066] 参考例５

４－ヨードコルヒチンの合成

コルヒチン100 mg（0.25 mmol）を酢酸2.5 mLに溶解し、N-ヨードコハク酸イミド（NIS）112.49 mg（0.5 mmol，2 eq）を加えて、アルゴン雰囲気下70℃にて7時間攪拌した。室温まで放冷し、反応液に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加えて数分間攪拌した後、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて塩基性にした。クロロホルムで4回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（5% → 10% メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物129.5 mg（収率 98.6%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.49（1H, s, H-8), 7.26（1H, d, J=10.6Hz, H-12),7.15（1H, br-d, J=6.8Hz, -NH), 6.84（1H, d, J=11.2Hz, H-11),

4.50 (1H, ddd, J=12.2, 6.2, 6.2Hz, H-7), 4.02 (3H, s, -OMe), 3.97 (3H, s, -OMe), 3.95 (3H, s, -OMe), 3.62 (3H, s, -OMe), 3.18 (1H, dd, J=13.5, 5.1Hz, H-5β), 2.43 (1H, ddd, J=13.7, 13.7, 6.0Hz, H-5α), 2.28 (1H, dddd, J=12.6, 12.6, 6.4, 6.4Hz, H-6β), 2.00 (3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$), 1.75 (1H, ddd, J=11.8, 11.8, 5.7Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%) : 525 (M^+, 68.6), 438 (100.0).

[0067] 実施例４

４－アミノコルヒチンの合成

コルヒチン-4-カルボン酸5.0 mg (0.011 mmol) をテトラヒドロフラン0.3 mLに溶解し、氷冷下トリエチルアミン2.3μL (0.0165 mmol, 1.5 eq) 、ジフェニルリン酸アジド (DPPA) 2.8 μL (0.013 mmol, 1.2 eq) を加え室温で4時間攪拌した。さらに水0.15 mLを加え、1時間煮沸還流した。反応液に飽和炭酸カリウム水溶液を加え、クロロホルムで4回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法 (10%メタノール/ クロロホルム) にて精製し、表題の化合物1.7 mg (収率 37%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] : 7.49 (1H, s, H-8), 7.33 (1H, d, J=10.8Hz, H-12), 7.09 (1H, br-s, -NH), 6.85 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.65 (1H, ddd, J=12.1, 6.1, 6.1Hz, H-7), 4.00 (3H, s, -OMe), 3.99 (3H, s, -OMe), 3.94 (3H, s, -OMe), 3.72 (2H, br-s, $-NH_2$), 3.55 (3H, s, -OMe), 2.63 (1H, dd, J=14.0, 5.1Hz, H-5β), 2.26 (1H, dddd, J=12.6, 12.6, 6.3, 6.3Hz, H-6β), 2.12 (1H, ddd, J=13.9, 13.9, 6.1Hz, H-5α), 2.00 (3H, s, -NHCO$\underline{CH_3}$), 1.80 (1H, ddd, J=11.7, 11.7, 5.6Hz, H-6α).

FAB-MS(NBA) m/z : 415 $[M+H]^+$.

[0068] 参考例６

グロリオサミンＡの合成

４－ヒドロキシー２，３－（メチレンジオキシ）－２，３－ジデメトキシコルヒチン2.3 mg (0.0057 mmol) をアセトン0.3 mLに溶解し、炭酸カリウム

3.6 mg（0.026 mmol，5 eq）、ヨウ化メチル3.5 μL（0.057 mmol，10 eq）を順に加え、50℃で8.5時間撹拌した。反応液に水を加えてクエンチし、クロロホルムで4回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（4%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物1.2 mg（収率 55%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.50（1H, s, H-8），7.77（1H, br-d, J=7.7Hz, -NH），7.26（1H, d, J=10.6Hz, H-12），6.85（1H, d, J=10.8Hz, H-11），6.03（1H, d, J=1.5Hz, $-OCH_2O-$），6.02（1H, d, J=1.5Hz, $-OCH_2O-$），4.62（1H, ddd, J=12.1, 6.1, 6.1Hz,H-7），4.01（3H, s, -OMe），3.92（3H, s, -OMe），3.69（3H, s, -OMe），3.11（1H, dd,J=13.5, 6.0Hz, H-5β），2.22（1H, dddd, J=12.5, 12.5, 6.2, 6.2Hz, H-6β），1.99（3H, s, $-NHCO\underline{CH_3}$），1.90（1H, ddd, J=13.2, 13.2, 6.7Hz, H-5α），1.80（1H, ddd, J=11.9, 11.9, 6.4Hz, H-6α）.

EI-MS m/z（%）：413（M^+, 91.5）.

[0069] 参考例７

４－ヒドロキシ－２，３－（メチレンジオキシ）－２，３－ジデメトキシコルヒチンの合成

２，３－ジデメチルコルヒチン38 mg（0.102 mmol）をアセトニトリル1 mLに懸濁し、炭酸カリウム112.8 mg（0.816 mmol，8 eq）、ブロモクロロメタン0.5 mL（過剰量）を加え、60℃で21時間撹拌した。反応液に水を加えてクエンチし、クロロホルムで3回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（4%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、２，３－（メチレンジオキシ）－２，３－ジデメトキシコルヒチン（コルニゲリン）21.4 mg（収率 55%）を得た。コルニゲリン20 mg（0.052 mmol）をジクロロメタン0.52 mLに溶解し、氷冷下塩化すず（IV）18.3 μL（0.156 mmol，3 eq）、ジクロロメチルメチルエーテル56.5 μL（0.624 mmol，12 eq

）を順に滴下、0℃、アルゴン雰囲気下、30分攪拌した後、室温まで昇温しさらに7時間攪拌した。反応液に氷、クロロホルムを加え1時間攪拌し、分液漏斗にあけて有機層を分取した後、10%水酸化ナトリウム次いで、水で洗浄した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥し、得られた残渣をそのまま次の反応に用いた。４－ホルミル－２，３－（メチレンジオキシ）－ジデメトキシコルヒチン18 mg（0.044 mmol）をメタノール0.44 mLに溶解し、80%モノペルオキシフタル酸マグネシウム（MMPP）81.9 mg（0.132 mmol，3 eq）を加え室温で18時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えクエンチし、1N塩酸で酸性とし、クロロホルムで4回抽出し、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（4%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物1.3 mg（収率 7%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.33（1H, s, H-8），7.32（1H, d, J=9.0Hz, H-12），6.92（1H, d, J=11.0Hz, H-11），6.02（1H, d, J=1.3Hz, $-OCH_2O-$），6.00（1H, d, J=1.3Hz, $-OCH_2O-$），4.63（1H, ddd, J=12.7, 6.5, 6.5Hz, H-7），4.01（3H, s, -OMe），3.64（3H, s, -OMe），3.14（1H, dd, J=13.5, 6.1Hz, H-5β），2.16（1H, dddd, J=12.3, 12.3, 6.1, 6.1Hz, H-6β），2.01（3H, s, $-NHCO\underline{CH_3}$），1.87（1H, ddd, J=13.0, 13.0, 6.7Hz, H-5α），1.78（1H, ddd, J=11.7, 11.7, 6.1Hz, H-6α）.

EI-MS m/z（%）：399（M^+, 75.3）

[0070] 参考例８

４－メトキシー１，２－（メチレンジオキシ）－１，２－ジデメトキシコルヒチンの合成

４－ヒドロキシー１，２－（メチレンジオキシ）－１，２－ジデメトキシコルヒチン7.0 mg（0.018 mmol）をアセトン0.28 mLに溶解し、炭酸カリウム12.4 mg（0.09 mmol，5 eq）、ヨウ化メチル22.6 μL（0.18 mmol，10 eq）を順に加え、室温で8時間、55℃で12時間、次いで70℃で8時間撹拌した。反応液に水を加えてクエンチし、クロロホルムで4回抽出、飽和食塩水で洗浄、

硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（4%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物2.0 mg（収率 27%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.41 (1H, s, H-8), 7.33 (1H, d, J=10.6Hz, H-12), 6.80 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 6.52 (1H, br-d, J=7.3Hz, -NH), 6.03 (1H, d, J=1.5Hz, $-OCH_2O-$), 5.89 (1H, d, J=1.5Hz, $-OCH_2O-$), 4.71 (1H, ddd, J=12.3, 6.3, 6.3Hz, H-7), 4.08 (3H, s, -OMe), 3.98 (3H, s, -OMe), 3.77 (3H, s, -OMe), 3.11 (1H, dd, J=13.8, 5.9Hz, H-5β), 2.28 (1H, dddd, J=12.7, 12.7, 6.4, 6.4Hz, H-6β), 2.02 (1H, ddd, J=13.4, 13.4, 6.4Hz, H-5α), 2.00 (3H, s, $-NHCO\underline{CH_3}$), 1.83 (1H, ddd, J=11.6, 11.6, 5.6Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%) : 413 (M^+, 67).

[0071] 参考例９

４－ヒドロキシー１，２－（メチレンジオキシ）－１，２－ジデメトキシコルヒチンの合成

１，２－ジデメチルコルヒチン100 mg（0.27 mmol）をアセトニトリル3 mLに懸濁し、炭酸カリウム298.5 mg（2.16 mmol, 8 eq）、ブロモクロロメタン1 mL（過剰量）を加え、60℃で19時間撹拌した。反応液に水を加えてクエンチし、クロロホルムで3回抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。シリカゲルカラムクロマトグラフ法（5%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、１，２－（メチレンジオキシ）－１，２－ジデメトキシコルヒチン110.5 mg（収率 定量的）を得た。

このもの60 mg（0.156 mmol）をジクロロメタン1.5 mLに溶解し、氷冷下塩化すず（IV）55 μL （0.468 mmol, 3 eq）、ジクロロメチルメチルエーテル0.17 mL（1.872 mmol, 12 eq）を順に滴下、0℃、アルゴン雰囲気下、30分撹拌した後、室温まで昇温しさらに6.5時間撹拌した。反応液に氷、クロロホルムを加え1時間撹拌、分液漏斗にあけて有機層を分取した後、10%水酸化ナトリウム次いで水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真

OnCusp
Ex. 1038

空乾燥し、得られた残渣をそのまま次の反応に用いた。４－ホルミル－１，２－（メチレンジオキシ）－１，２－ジデメトキシコルヒチン39 mg（0.095 mmol）をメタノール0.95 mLに溶解し、80%モノペルオキシフタル酸　マグネシウム（MMPP）117.5 mg（0.19 mmol，3 eq）を加え室温で18時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えクエンチし、1N塩酸で酸性とし、クロロホルムで4回抽出し、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（4%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物8 mg（収率 21%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.32（1H, s, H-8), 7.43（1H, d, J=10.8Hz, H-12),7.43（1H, d, J=11.0Hz, H-11), 6.00（1H, d, J=1.5Hz, $-OCH_2O-$), 5.87（1H, d, J=1.3Hz, $-OCH_2O-$), 4.70（1H, ddd, J=12.6, 6.5, 6.5Hz, H-7), 4.09（3H, s, -OMe), 4.00(3H, s, -OMe), 3.15（1H, dd, J=13.8, 6.0Hz, H-5β), 2.24（1H, dddd, J=12.7, 12.7,6.4, 6.4Hz, H-6β), 2.00（3H, s, $-NHCO\underline{CH_3}$), 1.96（1H, ddd, J=13.6, 13.6, 6.7Hz,H-5α), 1.84（1H, ddd, J=11.8, 11.8, 6.0Hz, H-6α).

EI-MS m/z（%）：399（M^+, 72.6).

[0072] 参考例１０

デアセチルコルヒチンの合成

コルヒチン100 mg（0.25 mmol）をアセトニトリル2.5 mLに溶解し、ジメチルアミノピリジン（DMAP）30.5 mg（0.25 mmol，1 eq）を加え、トリエチルアミン0.1 mL（0.75 mmol，3 eq）、二炭酸ジ-t-ブチル0.29 mL（1.25 mmol，5 eq）を順に滴下し、100℃で7.5時間煮沸還流した。反応液をクロロホルムで希釈し、飽和クエン酸水溶液で3回洗浄、得られた水層をクロロホルムで3回抽出後、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（1%メタノール/ 酢酸エチル）にて精製し、目的物のN－（t-ブトキシカルボニル）コルヒチン132.8 mg（収率 定量的）を得た。N－（t-ブ

OnCusp
Ex. 1038

トキシカルボニル）コルヒチン570 mg（1.14 mmol）をメタノール5mLに溶解し、1Mナトリウムメトキシド2.28 mL（2.28 mmol, 2eq）を滴下して室温で1時間攪拌した。反応液に飽和食塩水を加えてクエンチし、クロロホルムで4回抽出し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をそのまま次の反応に用いた。N－（t-ブトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン551 mg（1.20 mmol）をトリフルオル酢酸1.7 mL（22.8 mmol, 19 eq）に溶解し、室温で40分撹拌した。反応液に5M水酸化ナトリウムを加えて塩基性にし、クロロホルムで3回抽出し、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（10%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物377 mg（収率 88%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] : 7.74 (1H, s, H-8), 7.18 (1H, d, J=10.7Hz, H-12), 6.79 (1H, d, J=11.0Hz, H-11), 6.53 (1H, s, H-4), 3.99 (3H, s, -OMe), 3.90 (6H, s,-OMe X 2), 3.70 (1H, dd, J=11.0, 5.0 Hz, H-7), 3.65 (3H, s, -OMe), 2.47 (1H, dd,J=13.7, 6.3Hz, H-5β), 2.39 (1H, ddd, J=12.7, 12.7, 6.3Hz, H-5α), 2.30 (1H, dddd, J=12.2, 12.2, 6.1, 6.1Hz, H-6β), 1.60(1H, ddd, J=11.5, 11.5, 4.8Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%) : 357 (M^+, 100.0), 312 (76.8), 298 (76.5).

[0073] 参考例１１

デアセチルコルヒチン塩酸塩の合成

メタノール2 mLに氷冷下、アセチル　クロリド24 μL（0.34 mmol, 2 eq）を滴下して撹拌した。その溶液に、氷冷下、メタノール3 mLに溶解したデアセチルコルヒチン60 mg （0.17 mmol）を滴下し、1.5時間撹拌した。反応液を減圧留去、真空乾燥し、表題の化合物68.9 mgを得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] : 7.76 (1H, s, H-8), 7.32 (1H, d, J=10.0Hz, H-12), 6.89 (1H, d, J=11.2Hz, H-11), 6.55 (1H, s, H-4), 4.25 (1H, br-s, H-7), 3.96 (3H, s, -OMe), 3.93 (3H, s, -OMe), 3.92 (3H, s, -OMe), 3.70 (3H, s, -OMe), 2.72 (2H, br-s), 2.51 (2H, overlapped).

[0074] 実施例５

４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）コルヒチンの合成

4-クロロコルヒチン10 mg（0.023 mmol）をアセトニトリル0.5 mLに溶解し、ジメチルアミノピリジン2.8 mg（0.023 mmol，1 eq）を加え、トリエチルアミン9.6 μL（0.069 mmol，3 eq）、二炭酸ジ-t-ブチル26.4 μL（0.115 mmol，5 eq）を順に滴下し、100℃で10.5時間煮沸還流した。反応液をクロロホルムで希釈し、飽和クエン酸水溶液で3回洗浄、得られた水層をクロロホルムで3回抽出後、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（1% メタノール/ 酢酸エチル）にて精製し、表題の化合物9.2 mg（収率 75%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.56 (1H, s, H-8), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-12), 6.75 (1H, d, J = 11.0 Hz, H-11), 5.06 (1H, dd, J = 12.2, 6.1 Hz, H-7), 3.98 (3H, s, -OMe), 3.97 (3H, s, -OMe), 3.96 (3H, s, -OMe), 3.62 (3H, s, -OMe), 3.32 (1H, dd, J = 13.9, 4.9 Hz), 2.65-2.62 (1H, m), 2.30 (3H, s, $-COCH_3$), 2.28-2.21(1H, m), 1.99-1.91 (1H, m), 1.57 (9H, s, $-COOC(CH_3)_3$).

ESI-MS m/z：534 $[M+H]^+$.

[0075] 実施例６

４－クロロ－Ｎ－（t－ブトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン

4-クロロ-N-（t-ブトキシカルボニル）コルヒチン130 mg（0.24 mmol）をメタノール2.4 mLに溶解し、1M ナトリウムメトキシド 0.48 mL（0.48 mmol，2 eq）を滴下して室温で6時間攪拌した。反応液に飽和食塩水を加えてクエンチし、クロロホルムで4回抽出、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（2% → 5% メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物105.6 mg（収率 89%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.51 (1H, s, H-8), 7.21 (1H, d, J = 10

OnCusp
Ex. 1038

.7 Hz, H-12), 6.79 (1H, d, J = 10.7 Hz, H-11), 4.95 (1H, d, J = 7.8 Hz, -NH), 4.34-4.28 (1H, m, H-7), 4.00 (3H, s, -OMe), 3.98 (3H, s, -OMe), 3.97 (3H, s, -OMe), 3.62 (3H, s, -OMe), 3.23 (1H, dd, J = 13.3, 4.5 Hz), 2.30-2.11 (2H, m), 1.65-1.61 (1H,m), 1.38 (9H, s, -COOC(CH_3)$_3$).

ESI-MS m/z：492 $[M+H]^+$.

[0076] 実施例７

４－クロロデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-（t-ブトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン95 mg（0.19 mmol）をトリフルオロ酢酸0.27 mL（3.61 mmol, 19 eq）に溶解し、室温で20分撹拌した。反応液に5N水酸化ナトリウムを加えて塩基性にし、クロロホルムで3回抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（5% → 10% メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物65 mg（収率 87%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.75 (1H, s, H-8), 7.15 (1H, d, J=10.6Hz, H-12),6.79 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.01 (3H, s, -OMe), 3.96 (3H, s, -OMe), 3.95 (3H,s, -OMe), 3.62 (1H, overlapped, H-7), 3.61 (3H, s, -OMe), 3.19 (1H, dd, J=13.5,4.9Hz, H-5β), 2.29 (1H, dddd, J=12.6, 12.6, 4.2, 4.2Hz, H-6β), 2.16 (1H, ddd,J=13.4, 13.4, 6.1Hz, H-5α), 1.55 (1H, ddd, J=10.8, 10.8, 6.6Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%)：391 (M^+, 100.0), 393 ($[M+2]^+$, 34.7).

[0077] 実施例８

４－クロロデアセチルコルヒチン塩酸塩の合成

メタノール2 mLに氷冷下、アセチル クロリド20 μL（0.28 mmol, 2 eq）を滴下して撹拌した。その溶液に、氷冷下、メタノール1.5 mLに溶解した4-クロロデアセチルコルヒチン55 mg（0.14 mmol）を滴下し、1.5時間撹拌した。反応液を減圧留去、真空乾燥し、表題の化合物61.5 mgを得た。

OnCusp
Ex. 1038

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]：7.81 (1H, s, H-8), 7.35 (1H, d, J=10.6Hz, H-12), 6.96 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.21 (1H, br-s, H-7), 4.00 (6H, s, -OMe X 2), 3.98 (3H, s, -OMe), 3.65 (3H, s, -OMe), 3.29 (1H, br-dd, J=13.5, 5.5Hz), 2.62 (1H, m), 2.48 (1H, m), 2.23 (1H, m).

[0078] 実施例９

４－フルオロ－Ｎ－(ｔ-ブトキシカルボニル)コルヒチンの合成

4-フルオロコルヒチン12 mg (0.029 mmol) をアセトニトリル0.5 mLに溶解し、ジメチルアミノピリジン3.5 mg (0.029 mmol, 1 eq) を加え、トリエチルアミン12 μL (0.087 mmol, 3 eq) 、二炭酸ジ-t-ブチル33.3 μL (0.145 mmol, 5 eq) を順に滴下し、100℃で7.5時間煮沸還流した。反応液をクロロホルムで希釈し、飽和クエン酸水溶液で3回洗浄、得られた水層をクロロホルムで3回抽出後、有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法 (1% メタノール/ 酢酸エチル) にて精製し、表題の化合物12.2 mg (収率 81%) を得た。

[0079] 実施例１０

４－フルオロ－Ｎ－ (t-ブトキシカルボニル) デアセチルコルヒチンの合成

4-フルオロ-N- (t-ブトキシカルボニル) コルヒチン89 mg (0.17 mmol) をメタノール2mLに溶解し、1Mナトリウムメトキシド0.34 mL (0.34 mmol, 2 eq) を滴下して室温で1時間攪拌した。反応液に飽和食塩水を加えてクエンチし、クロロホルムで4回抽出、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥し、表題の化合物を得た。得られた化合物をそのまま次の反応に用いた。

[0080] 実施例１１

４－フルオロデアセチルコルヒチンの合成

4-フルオロ-N- (t-ブトキシカルボニル) デアセチルコルヒチン65 mg (0.14 mmol) をトリフルオロ酢酸0.2 mL (2.66 mmol, 19 eq) に溶解し、室温で40分撹拌した。反応液に5N水酸化ナトリウムを加えて塩基性にし、クロロホル

OnCusp
Ex. 1038

ムで3回抽出、飽和食塩水で洗浄、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（10% メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物55 mg（収率 定量的）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.75 (1H, s, H-8), 7.19 (1H, d, J=10.6Hz, H-12), 6.79 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.01 (3H, s, -OMe), 4.00 (3H, s, -OMe), 3.97 (3H,s, -OMe), 3.69 (1H, dd, J=10.9, 6.3Hz, H-7), 3.59 (3H, s, -OMe), 3.00 (1H, dd, J=13.7, 6.2Hz, H-5β), 2.29 (1H, dddd, J=12.8, 12.8, 6.4, 6.4Hz, H-6β), 2.02 (1H,ddd, J=13.5, 13.5, 6.9Hz, H-5α), 1.59 (1H, ddd, J=11.7, 11.7, 7.0Hz, H-6α).

EI-MS m/z (%)：375 (M^+, 68.4), 83 (100).

[0081] 実施例１２

４－フルオロデアセチルコルヒチン塩酸塩の合成

メタノール1.5 mLに氷冷下、アセチル クロリド21.3 μL（0.3 mmol, 2 eq）を滴下して撹拌した。その溶液に、氷冷下、メタノール1.5 mLに溶解した4－フルオロデアセチルコルヒチン55 mg（0.15 mmol）を滴下し、1.5時間撹拌した。反応液を減圧留去、真空乾燥し、表題の化合物44.5 mgを得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]：7.85 (1H, s, H-8), 7.42 (1H, d, J=10.8Hz, H-12), 7.00 (1H, d, J=10.8Hz, H-11), 4.27 (1H, br-s, H-7), 4.05 (3H, s, -OMe), 4.02 (3H,s, -OMe), 3.98 (3H, s, -OMe), 3.62 (3H, s, -OMe), 3.08 (1H, br-dd, J=14.0, 6.0Hz), 2.65 (1H, m), 2.52 (1H, m), 2.08 (1H, m).

[0082] 実施例１３

４－クロロ－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン10 mg（0.026 mmol）をジクロロメタン0.5 mLに溶解し、氷冷下ピリジン2.3 μL（0.029 mmol, 1.1 eq）、塩化プロピオニル2.3 μL（0.026 mmol, 1 eq）を順に滴下し、室温で1.5時間攪拌した。反応液に水を加えてクエンチし、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で塩基性に

した。クロロホルムで4回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（10%メタノール/ 酢酸エチル及び5%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物11.7 mg（収量 定量的）を得た。

^{1}H-NMR（400MHz, $CDCl_3$）δ [ppm]：7.49（1H, s, H-8）, 7.30（1H, d, J=11.0Hz, H-12）, 6.85（1H, d, J=10.8Hz, H-11）, 4.57（1H, ddd, J=12.0, 6.1, 6.1Hz, H-7）, 4.02（3H, s, -OMe）, 3.99（3H, s, -OMe）, 3.97（3H, s, -OMe）, 3.64（3H, s, -OMe）, 3.24（1H, dd, J=13.5, 5.0Hz, H-5β）, 2.29（3H, m）, 2.15（1H, ddd, J=13.4, 13.4, 6.2Hz, H-5α）, 1.80（1H, ddd, J=11.9, 11.9, 5.9Hz, H-6α）, 1.10（3H, dd, J=7.6, 7.6Hz, -NHCOCH$_2$CH$_3$）.

EI-MS m/z（%）： 446（M$^+$, 45.6）, 448（[M+2]$^+$, 17.3）, 55（100.0）.

[0083] 実施例１４

４－クロロ－Ｎ－ホルミルデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン11.8 mg（0.030 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド0.4mLに溶解し、ぎ酸エチル0.2 mLを加え80℃で3時間攪拌した。その後120℃に昇温し、22時間攪拌した。反応液を減圧留去し、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（5%メタノール/ クロロホルム及び7%メタノール/ 酢酸エチル）にて精製し、表題の化合物12.5 mg（収量 99%）を得た。

^{1}H-NMR（400MHz, $CDCl_3$）δ [ppm]：8.20（1H, s, -NHCOH）, 7.57（1H, br-d, J=6.8Hz, -NH）, 7.53（1H, s, H-8）, 7.30（1H, d, J=10.7Hz, H-12）, 6.86（1H, d, J=11.0Hz, H-11）, 4.64（1H, ddd, J=12.4, 6.3, 6.3Hz, H-7）, 4.02（3H, s, -OMe）, 4.00（3H, s, -OMe）, 3.98（3H, s, -OMe）, 3.63（3H, s, -OMe）, 3.27（1H, dd, J=13.3, 5.0Hz, H-5β）, 2.30（1H, dddd, J=12.6, 12.6, 6.2, 6.2Hz, H-6β）, 2.18（1H, ddd, J=13.3, 13.3, 6.1Hz, H-5α）, 1.87（1H, ddd, J=11.9, 11.9, 5.2Hz, H-6α）.

EI-MS m/z（%）： 418（M$^+$, 30.1）, 420（[M+2]$^+$, 12.8）, 55（100.0）.

OnCusp
Ex. 1038

[0084] 実施例１５

４－クロロ－Ｎ－（クロロアセチル）デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン24 mg（0.061 mmol）をジクロロメタン0.8 mLに溶解し、氷冷下トリエチルアミン13 μL（0.092 mmol, 1.5 eq）、塩化クロロアセチル5.8 μL（0.073 mmol, 1.2 eq）を順に加えて室温で30分間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えてクエンチし、クロロホルムで4回抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ法（1% → 5% → 10%メタノール/ クロロホルム）にて精製し、表題の化合物31.3 mg（収量 定量的）を得た。

^{1}H-NMR (400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm] : 7.70 (1H, br-d, J=6.8Hz, -NH), 7.40 (1H, s, H-8), 7.28 (1H, d, J=10.7Hz, H-12), 6.84 (1H, d, J=10.7Hz, H-11), 4.55 (1H, ddd, J=12.1, 6.2, 6.2Hz, H-7), 4.09 (1H, d, J=14.9Hz, -$\underline{CH_2}$Cl), 4.02 (1H, d, J=14.9Hz, -$\underline{CH_2}$Cl), 4.01 (3H, s, -OMe), 3.99 (3H, s, -OMe), 3.97 (3H, s, -OMe), 3.62 (3H, s,-OMe), 3.28 (1H, dd, J=13.2, 4.4Hz, H-5β), 2.29 (1H, dddd, J=12.1, 12.1, 6.0, 6.0Hz, H-6β), 2.19 (1H, ddd, J=13.1, 13.1, 5.9Hz, H-5α), 1.89 (1H, ddd, J=11.6,11.6, 5.0Hz, H-6α).

FAB-MS (NBA) m/z : 468 $[M+H]^+$.

[0085] 実施例１６

4-クロロ-N,N-ジメチルデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(90 mg, 0.230 mmol)のギ酸(690 μL)溶液に、室温でホルムアルデヒド(37% in water, 460 μL)を加えた後、アルゴンガス雰囲気下、2.5時間煮沸環流した。室温まで放冷後、クロロホルムと飽和重曹水を加えた。有機層を取り、水層はさらにクロロホルムにて抽出した。有機層を合わせて、無水硫酸ナトリウムにて乾燥後、ろ過、ろ液を濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製、目的物画分を濃縮乾固して標記化合物(

OnCusp
Ex. 1038

淡褐色固体, 55 mg, 0.130 mmol, 57%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 8.09 (1H, s), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.76 (1H, d, J=10.7 Hz), 3.99 (6H, s), 3.98 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.21-3.16 (1H, m), 2.59 (1H, dd, J=11.0, 5.9 Hz), 2.21-2.03 (2H, m), 2.16 (6H, br-s), 1.73-1.66 (1H, m).ESI-MS m/z: 420 $[M+H]^+$.

[0086] 実施例１７

4-クロロ-N,N-ジエチルデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(50 mg, 0.128 mmol)のメタノール-酢酸混液(100:1, 1.9 mL)に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてアセトアルデヒド(25 μL, 0.128×3.5 mmol)及びシアノ水素化ホウ素ナトリウム(18 mg, 0.128×2.2 mmol)を加えた。本混合液を室温で3時間撹拌した後、飽和重曹水と酢酸エチルを加えた。有機層を取り、ブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、次いで減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(淡黄色固体, 30 mg, 0.067 mmol, 53%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 8.11 (1H, s), 7.19 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.76 (1H, d, J=10.7 Hz), 3.99 (6H, s), 3.97 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.23-3.09 (2H, m), 2.82-2.31 (3H, m), 2.22-2.03 (2H, m), 1.81-1.60 (2H, m), 0.90 (6H, t, J=7.1Hz).

ESI-MS m/z: 448 $[M+H]^+$.

[0087] 実施例１８

4-クロロ-7-(ピペラジン-1-イル)-7-デ(アセチルアミノ)コルヒチンの合成

4-クロロ-N,N-ジエチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(淡褐色固体, 30 mg, 0.065 mmol, 51%)を得た。アセトアルデヒドの代わりにグルタルアルデヒドを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 8.20 (1H, s), 7.19 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.75 (1H, d, J=10.7 Hz), 3.99 (6H, s), 3.97 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.21-3.16 (1H, m), 2.75-2.64 (1H, m), 2.22-2.02 (2H, m), 1.70-1.49 (11H,

m).

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

[0088] 実施例１９

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)- 4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)- 4-クロロデアセチルコルヒチン(0.100 g, 0.203 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(有機合成用, 2 mL)溶液に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて水素化ナトリウム(60% in oil, 16 mg, 0.203×2 mmol)を添加して、20分間撹拌した。さらにヨウ化メチル(86 mg, 0.203×3 mmol)を加えて、氷冷下30分間、次いで室温で一晩撹拌した。反応液に酢酸エチルと飽和塩化アンモニウム溶液を加えて、有機層を取った。有機層はブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム-メタノール)にて精製、目的物画分を濃縮乾固して標記化合物(淡褐色個体, 67 mg, 0.132 mmol, 65%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.27 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.8Hz), 6.79 (1H, d, J=10.8 Hz), 4.68-4.57 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.97 (6H, s), 3.66 (3H, br-s), 3.34-3.29 (1H, m), 3.12 (3H, s), 2.24-2.10 (3H, m), 1.35 (9H, br-s).

ESI-MS m/z: 506 $[M+H]^+$.

[0089] 実施例２０

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)- 4-クロロ-N-エチルデアセチルコルヒチンの合成

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)- 4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(淡褐色固体, 81 mg, 0.155 mmol, 51%)を得た。ヨウ化メチルの代わりにヨウ化エチルを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.25 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.78 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.73-4.65 (1H, m), 3.99 (3H, s), 3.97 (6H, s)

, 3.64 (3H, br-s), 3.34-3.20 (3H, m), 2.19-2.08 (3H, m), 1.35 (9H, br-s), 1.15 (3H, t, J=7.0 Hz).

ESI-MS m/z: 520 $[M+H]^+$.

[0090] 実施例２１

N-アリル-4-クロロ-N-(tert-ブチルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)-4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(淡褐色固体, 117 mg, 0.219 mmol, 54%)を得た。ヨウ化メチルの代わりに臭化アリルを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.27 (1H, s), 7.18 (1H, d, J=10.8 Hz), 6.79 (1H, d, J=10.8 Hz), 5.87-5.77 (1H, m), 5.15-5.07 (2H, m), 4.80-4.68 (1H, m), 4.52 (1H, dd, J=16.8, 4.3 Hz), 4.00 (3H, s), 3.97 (6H, s), 3.84 (1H, dd, J=16.8, 5.5 Hz),3.65 (3H, s), 3.32-3.24 (1H, m), 2.20-2.02 (3H, m), 1.34 (9H, s).

ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$.

[0091] 実施例２２

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)-4-クロロ-N-(２-メチルアリル)デアセチルコルヒチンの合成

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)-4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(淡褐色固体, 59 mg, 0.108 mmol, 27%)を得た。ヨウ化メチルの代わりに3-ブロモ-2-メチルプロペンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.32 (1H, s), 7.20 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.80 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.86-4.73 (1H, m), 4.82 (1H, s), 4.67 (1H, s), 4.48 (1H, d, J=18.0 Hz), 4.00 (3H, s), 3.98 (6H, s), 3.73 (1H, d, J=18.0 Hz), 3.66 (3H, br-s), 3.29-3.20 (1H, m), 2.20-1.96 (3H, m), 1.72 (3H, s), 1.32 (9H, s).

ESI-MS m/z: 644 $[M+H]^+$.

[0092] 実施例２３

N-ベンジル-N-(tert-ブチルオキシカルボニル)-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)-4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(乳白色固体, 91 mg, 0.156 mmol, 51%)を得た。ヨウ化メチルの代わりに臭化ベンジルを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.40 (1H, s), 7.33-7.16 (6H, m), 6.81 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.26 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.92-4.82 (1H, m), 4.48 (1H, d, J=17.1 Hz), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.67 (3H, s), 3.20-3.15 (1H, m), 2.16-1.86 (3H, m), 1.27 (9H, s).

ESI-MS m/z: 582 $[M+H]^+$.

[0093] 実施例２４

4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成

N-(tert-ブチルオキシカルボニル)-4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチン(47 mg, 0.093 mmol)のジクロロメタン(750 μL)溶液に氷冷、アルゴンガス雰囲気下してトリフルオロ酢酸(300 μL)を添加した。本溶液を氷冷下にて5分間、次いで室温で2時間撹拌した。反応液を飽和重曹水で塩基性とした後、クロロホルムとブラインを加えた。有機層を取り、水層はクロロホルムで再び抽出した。有機層は合わせて、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製、目的物画分を濃縮乾固して標記化合物(淡褐色固体, 36 mg, 0.088 mmol, 95%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.71 (1H, s), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.78 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.20-3.16 (2H, m), 2.26 (3H, s), 2.23-2.09 (2H, m), 1.67-1.60 (1H, m).

ESI-MS m/z: 406 $[M+H]^+$.

[0094] 実施例２５

4-クロロ-N-エチルデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(淡黄褐色固体, 44 mg, 0.104 mmol, 76%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.75 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.78 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.56 (3H, s), 3.32-3.27 (1H, m), 3.20-3.14 (1H, m), 2.60-2.51 (1H, m), 2.35-2.27 (1H, m), 2.22-2.08 (2H,m), 1.64-1.55 (1H, m), 1.04 (3H, t, J=7.1 Hz).

ESI-MS m/z: 420 $[M+H]^+$.

[0095] 実施例２６

4-クロロ-N-エチルデアセチルコルヒチンの別途合成法

4-クロロデアセチルコルヒチン(0.150 g, 0.383 mmol)のジクロロメタン-酢酸混液(50:1, 7.7 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にて、アセトアルデヒド(20.4 μL, 0.383×0.95 mmol)を加えて10分間撹拌した。本溶液にトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム(0.179 mg, 0.383×2.2 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌しいた後、酢酸エチルと飽和重曹水を添加した。有機層を取り、ブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(乳白色固体, 97 mg, 0.231 mmol, 60%)を得た。

[0096] 実施例２７

4-クロロ-N-エチルデアセチルコルヒチン塩酸塩の合成法

メタノール(2 mL)に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてアセチルクロリド(24.6 μL, 0.231×1.5 mmol)を添加して、氷冷下1時間撹拌した。本溶液に、4-クロロ-N-エチルデアセチルコルヒチン(97 mg)のメタノール(2 mL)溶液を加えた後、減圧下濃縮乾固した。残留物を少量のクロロホルムに溶かし、ヘキサンを加えて固体化した。析出物をろ取、ヘキサンで洗浄後、減圧乾燥して標記化合物(淡黄色固体, 0.105 g, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 10.68 (1H, br-s), 10.57 (1H, br-s), 8.04

(1H, s), 7.48 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.04 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.08 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.90-3.83 (1H, m), 3.71 (3H, s), 3.38-3.11 (3H, m), 2.57-2.48 (2H, m), 2.25-2.14 (1H, m), 1.54 (3H, t, J=7.2 Hz).

[0097] 実施例２８

N-アリル-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(淡褐色固体, 44 mg, 0.104 mmol, 76%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.78 (1H, s), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.78 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.85-5.75 (1H, m), 5.07-4.97 (2H, m), 4.01 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.34 (1H, dd, J=11.0, 5.9 Hz), 3.26-3.17 (2H, m), 2.95 (1H, dd, J=14.2, 7.0 Hz), 2.24-2.10 (2H, m), 1.71-1.63 (1H, m).

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

[0098] 実施例２９

4-クロロ-N-(2-メチルアリル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(褐色固体, 30 mg, 0.068 mmol, 71%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.81 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.77 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.75 (1H, s), 4.72 (1H, s), 4.00 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.56 (3H, s), 3.30-3.26 (1H, m), 3.21-3.16 (1H, m), 3.09 (1H, d, J=14.2 Hz),2.87 (1H, d, J=14.2 Hz), 2.23-2.10 (2H, m), 1.70-1.63 (1H, m), 1.68 (3H, s).

ESI-MS m/z: 446 $[M+H]^+$.

[0099] 実施例３０

N-ベンジル-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-メチルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(乳白色固体, 40 mg, 0.084 mmol, 73%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.68 (1H, s), 7.25-7.13 (5H, m), 7.11 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 3.90 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.57 (1H, dd, J=13.8, 7.4 Hz), 3.41 (3H, s), 3.39-3.34 (1H, m), 3.15-2.91 (3H, m), 2.12-2.01 (2H, m), 1.61-1.55 (1H, m). ESI-MS m/z: 482 $[M+H]^+$.

[0100] 実施例３１

N-ベンジル-4-クロロデアセチルコルヒチン塩酸塩の合成

N-ベンジル-4-クロロデアセチルコルヒチン(0.132 g, 0.274 mmol)のメタノール(1 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて10%HCl-メタノール(166μL, 0.274×1.5 mmol)を添加した。本溶液を減圧下、濃縮乾固して標記化合物(乳白色固体, 142 mg, 0.274 mmol, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.13 (1H, s), 9.61 (1H, s), 7.45-7.29 (6H, m), 7.19 (2H, d, J=10.7 Hz), 7.10 (2H, d, J=10.7 Hz), 4.30-4.13 (2H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.72-3.64 (1H, m), 3.52 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J=13.9, 4.9 Hz), 2.20-1.97 (3H, m).

[0101] 実施例３２

4-クロロ-N-プロピルデアセチルコルヒチンの合成

N-アリル-4-クロロデアセチルコルヒチン(36 mg, 0.0833 mmol)の酢酸エチル(860 μL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて、10%パラジウム炭素(8 mg)及び臭化亜鉛(11 mg)を加えた。反応容器内を脱気した後、水素ガスで置換した。本懸濁液を室温、水素ガス雰囲気下にて一晩撹拌した。不要物をマイクロフィルター(0.45μm)により除去、ろ液を減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製、目的物画分を濃縮乾固して標記化合物(淡黄褐色固体, 16 mg, 0.037 mmol, 44%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.77 (1H, s), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.78 (1H, d, J=10.7Hz), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.29-3.25 (1H, m), 3.20-3.15 (1H, m), 2.50-2.43 (1H, m), 2.

26-2.09 (3H, m), 1.66-1.59 (1H, m), 1.50-1.39 (2H, m), 0.85 (3H, t, J =7.4 Hz).

ESI-MS m/z: 434 $[M+H]^+$.

[0102] 実施例３３

N-イソブチル-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

N-プロピルデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、4-クロロ-N-(2-メチルアリル)デアセチルコルヒチンから、標記化合物(乳白色固体, 4 mg, 0.0090 mmol, 17%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.79 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.76 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.26-3.14 (2H, m), 2.32-2.07 (4H, m), 1.69-1.60 (1H, m), 1.30-1.25 (1H, m), 0.89 (3H, d, J=6.6 Hz), 0.85 (3H, d, J=6.6 Hz).

ESI-MS m/z: 448 $[M+H]^+$.

[0103] 実施例３４

N-(アセトキシアセチル)-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(0.150 g, 0.383 mmol)のジクロロメタン(5.7 mL)溶液に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリエチルアミン(64.1 μL, 0.3831×1.2 mmol)次いでアセトキシアセチルクロリド(45.3 μL, 0.383×1.1 mmol)を添加した。本溶液を氷冷下、10分間次いで室温で3時間撹拌した。酢酸エチルと10%クエン酸を加えた後、有機層を取った。有機層を飽和重曹水次いでブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社IsoleraOne, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(乳白色固体, 0.142 g, 0.238 mmol, 76%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.45 (1H, s), 7.31 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.12 (1H, d, J=7.1 Hz), 6.86 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.63-4.58 (1H, m), 4.60 (1H, d, J=15.7 Hz), 4.54 (1H, d, J=15.7 Hz), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.30-3.25 (1H, m), 2.32-2.14 (2H,

m), 2.18 (3H, s), 1.90-1.83 (1H, m).

ESI-MS m/z: 492 $[M+H]^+$.

[0104] 実施例３５

4-クロロ-N-(ヒドロキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

N-(アセトキシアセチル)-4-クロロデアセチルコルヒチン(0.161 g, 0.327 mmol)のメタノール(3.3 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてナトリウムメトキシド(5M in MeOH, 65.4μL, 0.327 mmol)を添加した後、氷冷下5分間、次いで室温で30分間撹拌した。反応液にブラインと10%クエン酸を加え、クロロホルム(×2)で抽出した。有機層は合わせて、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(乳白色固体, 0.147 g, 0.327 mmol, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.68 (1H, s), 7.56 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.34 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.90 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.66-4.59 (1H, m), 4.20 (1H, d, J=16.3 Hz), 4.04 (1H, d, J=16.3 Hz), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.31-3.26 (1H, m), 2.33-2.14 (2H, m), 1.94-1.87 (1H, m).

ESI-MS m/z: 450 $[M+H]^+$.

[0105] 参考例１２

Trans-4-ヒドロキシ(シクロヘキサン)カルボン酸ベンジルの合成

Trans-４-ヒドロキシ(シクロヘキサン)カルボン酸(1.00 g, 6.94 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(69 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にて炭酸カリウム(0.959 g, 6.94 mmol)及び臭化ベンジル(825 μL, 6.94 mmol)を添加した。本懸濁液を室温で一晩撹拌した後、酢酸エチル-ヘキサン混液(1:1)を添加して不要物をろ去、次いで酢酸エチル-ヘキサン(1:1)で洗いこんだ。ろ液と洗浄液は合わせて、水(×3)次いでブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, ヘキサン/酢酸エチル)にて精製し、標

記化合物(白色固体, 1.567 g, 6.69 mmol, 96%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.39-7.30 (5H, m), 5.11 (2H, s), 3.61 (1H, tt, J=10.9, 4.0 Hz), 2.31 (1H, tt, J=12.0, 3.5 Hz), 2.08-2.00 (4H, m), 1.58-1.47 (3H, m), 1.34-1.23 (2H, m).

[0106] 参考例１３

1-メチルピペリジン-4-イルオキシカルボニルクロリド塩酸塩の合成

4-ヒドロキシ-1-メチルピペリジン(1 mL, 8.50 mmol)のアセトニトリル(17 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリホスゲン(2.52 g, 8.50 mmol)を加えて、室温に戻しながら一晩撹拌した。析出物をろ取、エーテル次いでヘキサンで洗浄した後、減圧乾燥して表記化合物(白色固体, 1.135 g, 62%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 12.94 (1H, br-s), 5.27-5.24 (1H, m), 3.47-3.41 (2H, m), 3.08-2.98 (2H, m), 2.83 (3H, d, J=4.9 Hz), 2.78-2.69 (2H, m), 2.24-2.18 (2H, m).

[0107] 参考例１４

1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-イルオキシカルボニルクロリドの合成

4-ヒドロキシ-1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン(2.00 g, 8.50 mmol)のアセトニトリル(17 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリホスゲン(2.52 g, 8.50 mmol)を加えて、室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液を濃縮乾固して、標記化合物(微褐色澄明の粘性液, 2.47 g, 8.29 mmol, 98%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.40-7.30 (5H, m), 5.13 (2H, s), 5.06-5.00 (1H, m), 3.79-3.73 (2H, m), 3.43-3.37 (2H, m), 2.01-1.92 (2H, m), 1.84-1.74 (2H, m).

[0108] 参考例１５

Trans-4-(クロロカルボニルオキシ)シクロヘキサンカルボン酸ベンジルの合成

OnCusp
Ex. 1038

Trans-4-ヒドロキシ(シクロヘキサン)カルボン酸ベンジルエステル(1.00 g, 4.27 mmol)のアセトニトリル(8.5 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリホスゲン(1.27g, 4.27 mmol)を加えて、室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液を濃縮乾固して、標記化合物(白濁粘性液, 1.27 g, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.39-7.31 (5H, m), 5.12 (2H, s), 4.83-4.76 (1H, m), 2.42-2.35 (1H, m), 2.18-2.08 (4H, m), 1.66-1.49 (4H, m).

[0109] 参考例１６

チオモルホリン-4-カルボニルクロリドの合成

チオモルホリン(500 μL, 5.28 mmol)のアセトニトリル(11 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリホスゲン(1.57 g, 5.28 mmol)を加えて、室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液を濃縮乾固して、標記化合物(淡褐色澄明液, 0.860 g, 5.19 mmol, 98%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 4.01-3.98 (2H, m), 3.91-3.88 (2H, m), 2.70-2.68 (4H, m).

[0110] 参考例１７

チオモルホリン-4-カルボニルクロリド 1,1-ジオキシドの合成

チオモルホリン 1,1-ジオキシド(0.500 g, 3.70 mmol)のアセトニトリル(7.4 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリホスゲン(1.10 g, 3.70 mmol)を加えて、室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液を濃縮乾固して得られた固体にヘキサンを添加して超音波処理した。固体をろ取、ヘキサンで洗浄、減圧乾燥して、標記化合物(白色個体, 0.731 g, 3.70 mmol, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 4.27-4.22 (2H, m), 4.15-4.10 (2H, m), 3.15-3.12 (4H, m).

[0111] 参考例１８

1-メチルピペラジン-4-カルボニルクロリド塩酸塩の合成

1-メチルピペラジン(500 μL, 4.54 mmol)のアセトニトリル(9 mL)溶液に

、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリホスゲン(1.35 g, 4.54 mmol)を加えて、室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液を濃縮乾固して得られた固体にジエチルエーテルを添加して超音波処理した。固体をろ取、ジエチルエーテル次いでヘキサンで洗浄、減圧乾燥して、標記化合物(白色個体, 0.904 g, 4.54 mmol, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 13.7 (1H, br-s), 4.45 (2H, d, J=15.1 Hz), 4.12 (1H, t, J=12.6 Hz), 3.88 (1H, t, J=12.6 Hz), 3.60-3.52 (2H, m), 2.98-2.89 (2H, m), 2.87 (3H, d, J=4.6 Hz).

[0112] 実施例３６

4-クロロ-N-(1-メチルピペラジン-4-イルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(30 mg, 0.0766 mmol)のジクロロメタン(1.5 mL)溶液に室温で、ピリジン(12.4 μL, 0.0766×2 mmol)及び1-メチルピペリジン-4-イルオキシカルボニルクロリド塩酸塩(25 mg, 0.0766×1.5 mmol)を添加した。本混合液を室温で一晩撹拌した後、クロロホルムと飽和重曹水を添加した。有機層を取り、水層はさらにクロロホルムにて抽出した。有機層は合わせて無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(淡黄色固体, 35 mg, 0.0654 mmol, 85%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.48 (1H, s), 7.24 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.81 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.43 (1H, d, J=6.6 Hz), 4.68-4.60 (1H, m), 4.37-4.30 (1H, m), 4.01(3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J=13.4, 4.6 Hz), 2.85-2.73 (2H, m), 2.58-2.39 (2H, m), 2.43 (3H, s), 2.33-2.13 (2H, m), 2.08-1.98 (2H, m), 1.89-1.69 (3H, m).

ESI-MS m/z: 533 $[M+H]^+$.

[0113] 実施例３７

4-クロロ-N-[1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-イルオキシカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(1-メチルピペラジン-4-イルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(乳白色固体, 62 mg, 0.0952 mmol, 83%)を得た。1-メチルピペリジン-4-イルオキシカルボニルクロリド塩酸塩の代わりに1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-イルオキシカルボニルクロリド(0.9 eq.)を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.53 (1H, d, J=8.3 Hz), 7.38-7.30 (5H, m), 7.26 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.82 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.31 (1H, d, J=7.8 Hz), 5.11 (2H, s), 4.73-4.67 (1H, m), 4.37-4.30 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.79-3.69 (2H, m), 3.59 (3H, s), 3.28-3.20 (3H, m), 2.33-2.12 (2H, m), 1.86-1.50 (5H, m).

ESI-MS m/z: 653 [M+H]$^+$.

[0114] 実施例３８

4-クロロ-N-(ピペリジン-4-イルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-イルオキシカルボニル]デアセチルコルヒチン(47 mg, 0.072 mmol)のメタノール-テトラヒドロフラン混液(2:1, 3 mL)に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて20%水酸化パラジウム-炭素(10 mg)を添加した。反応容器内を減圧にて脱気、続く水素ガスによって置換した(本操作は３回繰り返した)。反応混合液を室温、水素ガス雰囲気下にて３時間激しく撹拌した。不要物をマイクロフィルター(0.45μm)により除去し、ろ液を濃縮乾固して標記化合物(褐色固体, 37 mg, quant.)を得た。

ESI-MS m/z: 519 [M+H]$^+$.

[0115] 実施例３９

N-[trans-1-(ベンジルオキシカルボニル)シクロヘキサン-4-イルオキシカルボニル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

OnCusp
Ex. 1038

4-クロロ-N-[1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-イルオキシカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(淡黄色固体, 74 mg, 0.113 mmol, 82%)を得た。1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-イルオキシカルボニルクロリドの代わりに、Trans-4-(クロロカルボニルオキシ)シクロヘキサンカルボン酸ベンジルエステル(0.9 eq.)を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.50 (1H, s), 7.37-7.29 (5H, m), 7.25 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.81 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.12-5.09 (1H, m), 5.08 (2H, s), 4.50-4.43 (1H,m), 4.36-4.29 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J=13.3, 4.5 Hz), 2.34-2.12 (3H, m), 2.05-1.95 (4H, m), 1.71-1.64 (1H, m), 1.57-1.45 (2H, m), 1.41-1.28 (2H, m).

ESI-MS m/z: 652 $[M+H]^+$.

[0116] 実施例４０

4-クロロ-N-(チオモルホリン-4-カルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(50 mg, 0.128 mmol)のジクロロメタン(3.8 mL)溶液に、室温でトリエチルアミン(89 μL, 0.128×5.0 mmol)及びチオモルホリン-4-カルボニルクロリド(106 mg, 0.128×5.0 mmol)を添加した。本溶液をアルゴンガス雰囲気下、一晩煮沸環流した。反応液を室温まで放冷後、酢酸エチル及び10%クエン酸を添加して有機層を取った。有機層はさらに10%クエン酸次いでブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(微褐色固体, 47 mg,0.090 mmol, 70%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.80 (1H, s), 7.43 (1H, d, J=11.0 Hz), 6.96 (1H, d, J=11.0 Hz), 5.72 (1H, d, J=5.9 Hz), 4.57-4.51 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.80-3.65 (4H, m), 3.64 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J=13.3, 5.2 Hz), 2.64-2.53 (4H, m), 2.33-2.24 (1H,

m), 2.15-2.07 (1H, m), 1.94-1.86 (1H, m).

ESI-MS m/z: 521 $[M+H]^+$.

[0117] 実施例４１

4-クロロ-N-(1,1-ジオキソチオモルホリン-4-カルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(50 mg, 0.128 mmol)のジクロロメタン(有機合成用, 3.8 mL)溶液に、室温でトリエチルアミン(89 μL, 0.128×5.0 mmol)及びチオモルホリン-4-カルボニルクロリド 1,1-ジオキシド(0.202 g, 0.128×8.0 mmol)を添加した。本溶液をアルゴンガス雰囲気下、一晩煮沸環流した。反応液を室温まで放冷後、酢酸エチル及び10%クエン酸を添加して有機層を取った。有機層はさらに10%クエン酸次いでブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(淡褐色固体, 48 mg, 0.087 mmol, 68%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.76 (1H, s), 7.43 (1H, d, J=10.7Hz), 7.04 (1H, s), 6.98 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.55-4.49 (1H, m), 4.04 (3H, s), 4.03-3.93 (4H, m), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J=13.5, 5.5 Hz), 3.02-2.97 (4H, m), 2.34-2.26 (1H, m), 2.17-2.06 (1H, m), 1.99-1.91 (1H, m).

ESI-MS m/z: 553 $[M+H]^+$.

[0118] 実施例４２

4-クロロ-N-(1-メチルピペラジン-4-カルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(50 mg, 0.128 mmol)のジクロロメタン(3.8 mL)溶液に、室温でトリエチルアミン(54 μL, 0.128×3.0 mmol)及び1-メチルピペラジン-4-カルボニルクロリド塩酸塩 (0.127 g, 0.128×5.0 mmol)を添加した。本溶液をアルゴンガス雰囲気下、6時間沸環流した。反応液を室温まで放冷後、クロロホルム及び飽和重曹水を添加して有機層を取った。水層

OnCusp
Ex. 1038

はさらにクロロホルムで抽出した。有機層合わせてブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(淡褐色固体, 30 mg, 0.058 mmol, 45%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.52 (1H, s), 7.25 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.80 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.47-4.41 (1H, m), 3.98 (6H, s), 3.95 (3H, s), 3.79-3.66 (4H, m), 3.63 (3H, s), 3.24 (1H, dd, J=13.3, 4.3 Hz), 2.94-2.76 (4H, m), 2.60 (3H, s), 2.27-2.12 (2H, m), 1.96-1.86 (1H, m).

ESI-MS m/z: 518 $[M+H]^+$.

[0119] 実施例４３

N-ブチリル-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、 0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、 ブチリルクロリド（13 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、 室温に戻して40分撹拌した。反応液に水を加えをクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 52 mg, 0.113 mmol, 88%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.52 (1H, s), 7.30 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.85 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.79 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.61-4.55 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J = 12.8, 4.3 Hz), 2.25-2.23 (3H, m), 2.21-2.14 (1H, m), 1.81-1.77 (1H, m), 1.70-1.58 (3H, m), 0.92 (3H, t, J = 7.4 Hz)

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

[0120] 実施例４４

4-クロロ-N-イソブチリルデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した. そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、イソ酪酸クロリド(13 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え, 室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 9 mg, 0.019 mmol, 15%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.48 (1H, s), 7.31 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.84 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.38 (1H, d, J = 6.6 Hz), 4.58-4.54 (1H, m), 4.01 (3H, s),3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J = 12.6, 4.5 Hz), 2.48-2.47 (1H, m), 2.24-2.16 (2H, m), 1.82-1.77 (1H, m), 1.20 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.15 (3H, d, J = 6.6 Hz)

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

[0121] 実施例４５

4-クロロ-N-（シクロプロパンカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、シクロプロパンカルボニルクロリド（12 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体, 58 mg, 0.126 mmol, 99%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.71 (1H, s), 7.36 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.91 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.83 (1H, br.s), 4.64-4.58 (1H, m), 4.0

OnCusp
Ex. 1038

3 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J = 13.5, 5.0 Hz), 2.30-2.27 (1H, m), 2.18-2.10 (1H, m), 1.88-1.84 (1H, m), 1.56-1.52 (1H, m), 0.88-0.86 (2H, m), 0.75-0.73 (2H, m).

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

[0122] 実施例４６

4-クロロ-N-イソバレリルデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、イソバレリルクロリド (16 μl, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (褐色固体, 57 mg, 0.120 mmol, 94%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.47 (1H, s), 7.29 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.83 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.24 (1H, d, J = 7.3 Hz), 4.61-4.57 (1H, m), 4.01 (3H, s),3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J = 13.4, 4.4 Hz), 2.27-2.04 (5H, m), 1.77-1.74 (2H, m), 0.95 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.92 (3H, d, J = 6.1Hz).

ESI-MS m/z: 476 $[M+H]^+$.

[0123] 実施例４７

4-クロロ-N-ヘプタノイルデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、ヘプタノイルクロリド (20 μl, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で

OnCusp
Ex. 1038

洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biorage Isorela One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 59 mg, 0.117 mmol, 92%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.48 (1H, s), 7.29 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.84 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.38 (1H, br.s), 4.58-4.55 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 2.26-2.11 (2H, m), 1.78-1.75 (1H, m), 1.62-1.54 (2H, m), 1.29-1.27 (8H, m), 0.88-0.84 (3H, m).

ESI-MS m/z: 504 $[M+H]^+$.

[0124] 実施例４８

4-クロロ-N-（シクロヘキサンカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、シクロヘキサンカルボニルクロリド（17 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 18 mg, 0.036 mmol, 28%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.47 (1H, s), 7.29 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.83 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.23 (1H, d, J = 6.6 Hz), 4.58-4.52 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J = 12.8, 4.5 Hz), 2.26-2.12 (3H, m), 1.94-1.90 (2H, m), 1.82-1.76 (1H, m), 1.66-1.63 (2H, m), 1.50-1.15 (5H, m).

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

[0125] 実施例４９

N-ベンゾイル-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（150 mg, 0.383 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（57 μl, 0.383 × 1.1 mmol)、ベンゾイルクロリド（44 μl, 0.383 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。

有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isorela One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 146 mg, 0.294 mmol, 77%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.80-7.79 (2H, m), 7.63 (1H, s), 7.49-7.47 (1H, m), 7.41-7.37 (2H, m), 7.35 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.93 (1H, br.s), 6.88 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.80-4.78 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd, J = 13.5, 5.2 Hz), 2.37-2.32 (1H, m), 2.25-2.22 (1H, m), 1.98-1.94 (1H, m).

ESI-MS m/z: 496 $[M+H]^+$.

[0126] 実施例５０

4-クロロ-N-(フェニルアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（21 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、フェニルアセチルクロリド（25 μl, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、室温に戻して40分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 44 mg, 0.086 mmol, 67%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.45 (1H, s), 7.38-7.26 (6H, m), 6.86

(1H, d, J = 10.7 Hz), 6.39 (1H, br.s), 4.57-4.51 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.65-3.56 (2H, m), 3.61 (3H, s), 3.21-3.19 (1H, m), 2.16-2.08 (1H, m), 1.97-1.86 (1H, m), 1.74-1.70 (1H, m).

ESI-MS m/z: 510 $[M+H]^+$.

[0127] 実施例５１

4-クロロ-N-（ピリジン-3-イルカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（47 μl, 0.128 × 2.7 mmol)、ニコチン酸クロリド塩酸塩（27 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（45 mg）を得たが、これには原料が20%含まれていた。そこでこのうち20 mg をジクロロメタン（0.8 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl)、ニコチン酸クロリド塩酸塩（11 mg)を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 20 mg, 0.040 mmol, 71%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 9.27 (1H, s), 8.71 (1H, d, J = 3.7 Hz), 8.24 (1H, d, J = 8.3 Hz), 7.98 (1H, br.s), 7.54 (1H, s), 7.42 (1H, dd, J = 7.4, 5.2 Hz), 7.32 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.86 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.82-4.76 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd, J = 13.4, 4.9 Hz), 2.38-2.33 (1H, m), 2.25

-2.22 (1H, m), 2.15-2.08 (1H, m).

ESI-MS m/z: 497 $[M+H]^+$.

[0128] 実施例５２

4-クロロ-N-(ピリジン-4-イルカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (47 μl, 0.128 × 2.7 mmol)、イソニコチン酸クロリド塩酸塩 (27 mg, 0.128 × 1.2 mmol) を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 67 mg, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.65 (2H, d, J = 5.9 Hz), 8.28 (1H, br.s), 7.74 (2H, d, J = 5.9 Hz), 7.54 (1H, s), 7.36 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.90 (1H, d, J =11.0 Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.71 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.2, 4.6 Hz), 2.39-2.34 (1H, m), 2.24-2.20 (1H, m), 2.10-2.02 (1H, m).

ESI-MS m/z: 497 $[M+H]^+$.

[0129] 実施例５３

4-クロロ-N-(ピリジン-2-イルカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (160 mg, 0.408 mmol) をジクロロメタン (4 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (86 μl, 0.408 × 1.5 mmol)、ピコリン酸クロリド塩酸塩 (88 mg, 0.408 × 1.2 mmol) を加え、室温に戻して終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 25 g,

メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体，136 mg，0.274 mmol，67%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：8.60-8.58 (1H，m)，8.05 (1H，d，J = 7.8 Hz)，7.83 (1H，dd，J = 7.7，6.5 Hz)，7.48-7.46 (1H，m)，7.45 (1H，s)，7.26 (1H，d，J = 10.2 Hz)，6.79 (1H，d，J = 10.7 Hz)，4.75-4.69 (1H，m)，4.01 (3H，s)，3.99 (3H，s)，3.97 (3H，s)，3.69 (3H，s)，3.33 (1H，dd，J = 12.7，4.4 Hz)，2.41-2.23 (2H，m)，2.01-1.97 (1H，m)．

ESI-MS m/z：497 $[M+H]^+$．

[0130] 実施例５４

4-クロロ-N-(トリフルオロアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg，0.128 mmol）をジクロロメタン（6 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリフルオロ酢酸無水物（38 μl）を加え、0℃で30分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP 10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体，56 mg，0.115 mmol，90%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：8.64 (1H，br.s)，7.44 (1H，s)，7.34 (1H，d，J = 10.5 Hz)，7.34 (1H，d，J = 11.0 Hz)，4.64-4.58 (1H，m)，4.03 (3H，s)，4.00 (3H，s)，3.99 (3H，s)，3.63 (3H，s)，3.31 (1H，dd，J = 13.8，5.7 Hz)，2.41-2.33 (1H，m)，2.20-2.17 (1H，m)，2.09-2.01 (1H，m)．

ESI-MS m/z：488 $[M+H]^+$．

[0131] 実施例５５

4-クロロ-N-（メトキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg，0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミ

ン（26 μl，0.128 × 1.5 mmol）、メトキシアセチルクロリド（14 μl，0.128 × 1.2 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP 10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体，41 mg，0.088 mmol，69%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：7.40（1H，s），7.26-7.24（1H，m），7.00（1H，d，J = 7.3 Hz），6.81（1H，d，J = 10.7 Hz），4.60-4.54（1H，m），4.01（3H，s），3.99（3H，s），3.97（3H，s），3.91（1H，d，J = 15.1 Hz），3.83（1H，d，J = 15.1 Hz），3.61（3H，s），3.46（3H，s），3.29-3.26（1H，m），2.25-2.18（2H，m），1.86-1.81（1H，m）.

ESI-MS m/z：464 $[M+H]^+$.

[0132] 実施例５６

4-クロロ-N-（フェノキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg，0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（26 μl，0.128 × 1.5 mmol)、フェノキシアセチルクロリド（17 μl，0.128 × 1.2 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体，36 mg，0.068 mmol，54%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：7.39（1H，s），7.35（2H，dd，J = 8.1，7.4 Hz），7.26（1H，d，J = 10.7 Hz），7.06（2H，t，J = 7.3 Hz），6.95（2H，d，J = 8.1 Hz），6.81（1H，d，J = 10.7 Hz），4.65-.4.59（1H，m），4.54（1H，d，J = 15.1 Hz），4.43（1H，d，J = 14.9 Hz），4.00（3H，s），4.00

(3H, s), 3.97 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.29-3.27 (1H, m), 2.25-2.20 (2H, m), 1.90-1.82 (1H, m).

ESI-MS m/z: 526 $[M+H]^+$.

[0133] 実施例５７

4-クロロ-N-[(メチルチオ)アセチル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、(メチルチオ)酢酸 (13 μl, 0.128 × 1.2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (21 mg, 0.128 × 1.2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mol) を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 31 mg, 0.065 mmol, 51%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.43 (1H, s), 7.29 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.83 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.59-4.53 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.30-3.28 (1H, m), 3.25 (1H, d, J = 16.3 Hz), 3.17 (1H, d, J = 16.3 Hz), 2.28-2.20 (2H, m), 2.17 (3H, s), 1.89-1.86 (1H, m).

ESI-MS m/z: 480 $[M+H]^+$.

[0134] 実施例５８

4-クロロ-N- [(4-ピリジルチオ)アセチル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、(4-ピリジルチオ)酢酸 (26 mg, 0.128 × 1.2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (21 mg, 0.128 ×

1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 45 mg, 0.083 mmol, 65%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.50 (2H, d, J = 4.9 Hz), 7.94 (1H, d, J = 6.6 Hz), 7.36 (1H, s), 7.34 (2H, d, J = 4.9 Hz), 7.25 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.80 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.57-4.51 (1H, m), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.96 (1H, d, J = 16.3 Hz), 3.77 (1H, d, J = 16.3 Hz), 3.61 (3H, s), 3.28-3.19 (1H, m), 2.16-2.11 (2H, m), 1.88-1.85 (1H, m).

ESI-MS m/z: 543 $[M+H]^+$.

[0135] 実施例５９

N-（4-ブロモブチリル）-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ブロモ酪酸（43 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えてクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 27 mg, 0.070 mmol, 39%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.47 (1H, s), 7.30 (1H, d, J = 11.0 Hz

OnCusp
Ex. 1038

), 6.85 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.65-6.64 (1H, br.s), 4.59-4.53 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.55 (1H, t, J = 6.2 Hz), 3.42 (1H, t, J = 6.5 Hz), 3.26 (1H, dd, J = 13.2, 4.4 Hz), 2.49-2.39 (1H, m), 2.29-2.11 (3H, m), 2,11-2.06 (1H, m), 1.80-1.75 (1H, m).

ESI-MS m/z: 540 $[M+H]^+$.

[0136] 実施例６０

4-クロロ-N-(4-フルオロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、4-フルオロベンゾイルクロリド (15 μl, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。

有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (褐色固体, 45 mg, 0.088 mmol, 68%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.83-7.79 (2H, m), 7.57 (1H, s), 7.36 (1H, br.s), 7.34 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.01-6.99 (2H, m), 6.88 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.4, 5.4 Hz), 2.37-2.33 (1H, m), 2.24-2.20 (1H, m), 1.97-1.94 (1H, m)ESI-MS m/z: 514 $[M+H]^+$.

[0137] 実施例６１

4-クロロ-N-(3,5-ジフルオロベンゾイル) デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、3,5-ジフルオロベンゾイルクロリド (16 μl, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を

加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（赤褐色固体, 50 mg, 0.094 mmol, 73%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.92 (1H, br.s), 7.63 (1H, s), 7.37 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.34-7.30 (2H, m), 6.92 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.85-6.83 (1H, m), 4.79-4.73 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.69 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.42-2.33 (1H, m), 2.23-2.20 (1H, m), 2.09-2.04 (1H, m).

ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$.

[0138] 実施例６２

4-クロロ-N-（3,4,5-トリフルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、3,4,5-トリフルオロベンゾイルクロリド（17 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して30分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（赤褐色固体, 38 mg,0.069 mmol, 54%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.26 (1H, br.s), 7.65 (1H, s), 7.49-7.47 (2H, m), 7.40 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.95 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.05 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.68 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.5, 5.6 Hz), 2.39-2.35 (1H, m), 2.20.2.15 (2H, m).

ESI-MS m/z: 550 $[M+H]^+$.

[0139] 実施例６３

4-クロロ-N-（4-メトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、4-メトキシベンゾイルクロリド（26 mg, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage isorela One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 56 mg, 0.106 mmol, 83%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.75 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.54 (1H, s), 7.31 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.87 (2H, d, J = 9.0 Hz), 6.85 (1H, br.s), 6.84 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.00 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd, J = 13.3, 4.5 Hz), 2.38-2.29 (1H, m), 2.25-2.21 (1H, m), 1.92-1.89 (1H, m).

ESI-MS m/z: 526 $[M+H]^+$.

[0140] 実施例６４

4-クロロ-N-（3,4,5-トリメトキシベンゾイル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した. そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、3,4,5-トリメトキシベンゾイルクロリド（30 mg, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体,

68 mg,0.116 mmol, 91%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.75 (1H, s), 7.63 (1H, br.s), 7.40 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.07 (2H, s), 6.93 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.79-4.72 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd, J = 13.5, 5.5 Hz), 2.42-2.33 (1H, m), 2.22-2.16 (1H, m), 2.09-2.03 (1H, m).

ESI-MS m/z: 586 $[M+H]^+$.

[0141] 実施例６５

4-クロロ-N-(2-メトキシベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、2-メトキシベンゾイルクロリド (17 μl, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して30分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (淡黄色固体, 49 mg, 0.093mmol, 73%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.35 (1H, d, J = 6.6 Hz), 8.01 (1H, dd, J = 7.7, 1.8 Hz), 7.51 (1H, s), 7.48-7.44 (1H, m), 7.28 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.00 (2H, m), 6.80 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.79-4.73 (1H, m), 4.05 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd, J = 13.2, 4.6 Hz), 2.40-2.31 (1H, m), 2.27-2.23 (1H, m), 1.89-1.85 (1H, m).

ESI-MS m/z: 526 $[M+H]^+$.

[0142] 実施例６６

4-クロロ-N-(3-メトキシベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol)

をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol）、3-メトキシベンゾイルクロリド（17 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して30分撹拌した。0分後、反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 53 mg, 0.101 mmol, 79%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.54 (1H, s), 7.34-7.31 (3H, m), 7.27 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.02-7.00 (1H, m), 6.96 (1H, d, J = 5.4 Hz), 6.85 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.01 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.3, 5.0 Hz), 2.39-2.30 (1H, m), 2.25-2.21 (1H, m), 1.95-1.89 (1H, m).

ESI-MS m/z: 526 $[M+H]^+$.

[0143] 実施例６７

4-クロロ-N-［(フェニルチオ）アセチル］デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（26 μl, 0.128 × 1.2 mmol）、(フェニルチオ)アセチルクロリド（23 μl, 0.128 × 1.5 mmol）を加え、室温に戻して30分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体, 41 mg, 0.076 mmol, 59%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.48 (1H, s), 7.35-7.32 (6H, m), 7.25-7.23 (1H, m), 6.87 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.54-4.49 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.72 (1H, d, J = 16.8 Hz), 3.63 (1H,

d, J = 16.8 Hz), 3.60 (3H, s), 3.23 (1H, dd, J = 12.7, 4.6 Hz), 2.17-2.02 (2H, m), 1.79-1.76 (1H, m).

ESI-MS m/z: 542 $[M+H]^+$.

[0144] 実施例６８

4-クロロ-N- [3-(ジメチルアミノ)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、3-(ジメチルアミノ)安息香酸 (25 mg, 0.128 × 1.2 mol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (21 mg, 0.128 × 1.2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mol) を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 37 mg, 0.069 mmol, 54%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.96 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.28 (1H, t, J = 7.9 Hz), 7.20-7.17 (3H, m), 7.13 (1H, d, J = 2.0 Hz), 7.05 (1H, d, J = 11.2 Hz), 6.89 (1H, dd, J = 8.1, 2.4 Hz), 4.51-4.45 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.16 (1H, dd, J = 12.1, 5.5 Hz), 2.92 (6H, s), 2.21-2.10 (2H, m), 2.07-2.03 (1H, m).

ESI-MS m/z: 539 $[M+H]^+$.

[0145] 実施例６９

4-クロロ-N- [4-(ジメチルアミノ)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ジメチルアミノ安息香酸 (25 mg, 0.128 × 1.2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (29 mg, 0.1

28 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 38 mg, 0.070 mmol, 55%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.71 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.50 (1H, s), 7.28 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.83 (1H, d, J = 7.8 Hz), 6.80 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.73 (2H, d, J = 8.3 Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd, J = 12.9, 4.1 Hz), 3.01 (6H, s), 2.32-2.23 (2H, m), 1.95-1.88 (1H, m).

ESI-MS m/z: 539 $[M+H]^+$.

[0146] 実施例７０

4-クロロ-N-（2-フルオロベンゾイル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、2-フルオロベンゾイルクロリド（15 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体, 46 mg, 0.090mmol, 70%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.96-7.94 (1H, m), 7.55 (1H, s), 7.52-7.48 (1H, m), 7.33 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.26-7.14 (4H, m), 6.85 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.79-4.73 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.01 (3H, s), 4.01

(3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd, J = 13.5, 5.2 Hz), 2.42-2.32 (1H, m), 2.27-2.21 (1H, m), 1.95-1.87 (1H, m).

ESI-MS m/z: 514 $[M+H]^+$.

[0147] 実施例７１

4-クロロ-N-(3-フルオロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン(50 mg, 0.128 mmol)をジクロロメタン(2 mL)に溶解し、0℃に冷却した. そこへトリエチルアミン(19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、3-フルオロベンゾイルクロリド(15 μl, 0.128 × 1 mmol)を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SNAP10 g, メタノール/クロロホルム)で精製し、標記の化合物(赤褐色固体, 21 mg, 0.041mmol, 32%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.82 (1H, s), 7.66 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.55-7.53 (2H, m), 7.47 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.35-7.33 (1H, m), 7.15-7.13 (1H, m), 6.99 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.82-4.77 (1H, m), 4.05 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd, J = 13.1, 5.7 Hz), 2.41-2.32 (1H, m), 2.29-2.19 (1H, m), 2.16-2.08 (1H, m).

ESI-MS m/z: 514 $[M+H]^+$.

[0148] 実施例７２

4-クロロ-N-(2,4-ジフルオロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、2,4-ジフルオロ安息香酸(24 mg, 0.128 × 1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(1 mL)に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(21 mg, 0.128 × 1.2 mmol)を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコル

ヒチン（50 mg, 0.128 mol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 25 mg, 0.047 mmol, 37%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.02-7.96 (1H, m), 7.64 (1H, s), 7.38 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.20-7.17 (1H, m), 7.00-6.89 (3H, m), 4.78-4.71 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.69 (3H, s), 3.32 (1H, dd, J = 14.0, 4.8 Hz), 2.42-2.32 (1H, m), 2.24-2.21 (1H, m), 1.98-1.91 (1H, m).

ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$.

[0149] 実施例７３

4-クロロ-N-（ピリジン-3-イルオキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、ピリジン-3-イルオキシ酢酸（24 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 36 mg, 0.068 mmol, 53%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.47 (1H, s), 8.35 (1H, s), 7.47 (1H, d, J = 5.9 Hz), 7.39 (1H, s), 7.36-7.32 (2H, m), 7.26 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.81 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.65-4.62 (1H, m), 4.60 (1H, d, J

OnCusp
Ex. 1038

= 14.9 Hz), 4.53 (1H, d, J = 14.6 Hz), 4.00 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.29 (1H, dd, J = 12.4, 4.1 Hz), 2.32-2.20 (2H, m), 1.97-1.94 (1H, m).

ESI-MS m/z: 527 $[M+H]^+$.

[0150] 実施例７４

4-クロロ-N-（ピリジン-2-イルアセチル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、2-ピリジル酢酸塩酸塩（27 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（21 μl, 0.128 × 1.2 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg,0.128 mol）を加え、室温に戻して4時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、10% クエン酸水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 15 mg, 0.029 mmol, 23%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.01 (1H, d, J = 7.3 Hz), 8.52 (1H, d, J = 4.4 Hz), 7.81 (1H, t, J = 7.1 Hz), 7.38-7.32 (2H, m), 7.24 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.27-4.21 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.75 (2H, s), 3.49 (3H, s), 3.13 (1H, dd, 13.3, 5.0 Hz), 2.15-2.11 (1H, m), 2.02-1.98 (1H, m), 1.91-1.88 (1H, m).

ESI-MS m/z: 511 $[M+H]^+$.

[0151] 実施例７５

4-クロロ-N-（ピリジン-3-イルアセチル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、3-ピリジル酢酸塩酸塩（27 mg, 0.128 × 1.2 mmol）

をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（21 μl, 0.128 × 1.2 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg,0.128 mol）を加え、室温に戻して4時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、10% クエン酸水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 8 mg, 0.016 mmol, 11%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.06 (1H, d, J = 7.3 Hz), 8.70 (2H, s), 8.22 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.81 (1H, t, J = 6.7 Hz), 7.13 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.12 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.27-4.20 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.78-3.77 (2H, m), 3.48 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J = 13.2, 5.1 Hz), 2.18-2.09 (1H, m), 2.06-1.97 (1H, m), 1.92-1.85 (1H, m).

ESI-MS m/z: 511 $[M+H]^+$.

[0152] 実施例７６

4-クロロ-N-（メトキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、クロロぎ酸メチル（10 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isorela One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 48 mg, 0.107 mmol,

83%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.50 (1H, s), 7.24 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.80 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.27 (1H, d, J = 6.1 Hz), 4.37-4.30 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J = 14.1, 5.1 Hz), 2.31-2.13 (2H, m), 1.73-1.65 (1H, m).

ESI-MS m/z: 450 $[M+H]^+$.

[0153] 実施例７７

4-クロロ-N-（エトキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（260 mg, 0.664 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（109 μl, 0.664 × 1.2 mmol)、クロロぎ酸エチル（95 μl, 0.664 × 1.5 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 106 mg, 0.228 mmol, 34%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.53 (1H, s), 7.25 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.81 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.24 (1H, d, J = 7.3 Hz), 4.37-4.31 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.06-4.01 (2H, m), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J = 14.0, 5.2 Hz), 2.31-2.13 (2H, m), 1.72-1.68 (1H, m), 1.20 (3H, t, J = 7.1 Hz).

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

[0154] 実施例７８

4-クロロ-N-（イソプロピルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミ

ン（19 μl，0.128 × 1.1 mmol）、クロロぎ酸イソプロピル（15 μl，0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP 10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体，53 mg，0.111 mmol，87%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：7.52（1H，s），7.24（1H，d，J = 10.7 Hz），6.80（1H，d，J = 10.7 Hz），5.07（1H，d，J = 7.3 Hz），4.81-4.75（1H，m），4.37-4.31（1H，m），4.01（3H，s），3.99（3H，s），3.97（3H，s），3.60（3H，s），3.25（1H，dd，J = 13.2，4.1 Hz），2.25-2.16（2H，m），1.71-1.65（1H，m），1.21（3H，d，J = 6.3 Hz），1.18（3H，d，J = 6.1 Hz）.

ESI-MS m/z：478 $[M+H]^+$.

[0155] 実施例７９

4-クロロ-N-（イソブチルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg，0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl，0.128 × 1.1 mmol)、クロロぎ酸イソブチル（17 μl，0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP 10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体，58 mg，0.118 mmol，92%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：7.57（1H，s），7.27（1H，d，J = 10.5 Hz），6.83（1H，d，J = 10.7 Hz），5.26（1H，d，J = 6.8 Hz），4.38-4.32（1H，m），4.01（3H，s），3.98（3H，s），3.97（3H，s），3.77-3.72（2H，m），3.60（3H，s），3.26（1H，dd，J = 13.4，4.9 Hz），2.32-2.23（1H，m），2.18-

2.15 (1H, m), 1.91-1.81 (1H, m), 1.76-1.68 (1H, m), 0.89 (6H, d, J = 6.6 Hz).

ESI-MS m/z: 492 $[M+H]^+$.

[0156] 実施例８０

4-クロロ-N-（フェノキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、クロロぎ酸フェニル（16 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。

有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 20 mg, 0.039 mmol, 31%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.64 (1H, s), 7.31-7.27 (3H, m), 7.18-7.15 (1H, m), 7.06-7.05 (2H, m), 6.83 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.63 (1H, d, J = 6.8 Hz), 4.45-4.39 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.52 (3H, s), 3.30 (1H, dd, J = 13.5, 5.2 Hz), 2.41-2.32 (1H, m), 2.23-2.19 (1H, m), 1.83-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 512 $[M+H]^+$.

[0157] 実施例８１

N-(ベンジルオキシカルボニル)-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（300 mg, 0.766 mmol）をジクロロメタン（6 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（115 μl, 0.766 × 1.1 mmol)、クロロぎ酸ベンジル（108 μl, 0.766 × 1 mmol）を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。

得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 105 mg, 0.200 mmol, 26%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.57 (1H, s), 7.34-7.30 (5H, m), 7.26 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.82 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.38 (1H, d, J = 6.8 Hz), 5.08 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.94 (1H, d, J = 12.2 Hz), 4.40-4.34 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J = 12.7, 4.9 Hz), 2.32-2.25 (1H, m), 2.21-2.13 (1H, m), 1.76-1.69 (1H, m).

ESI-MS m/z: 526 $[M+H]^+$.

[0158] 実施例８２

4-クロロ-N-(メタンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、メタンスルホニルクロリド（12 μl, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和重曹水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 57 mg, 0.121 mmol, 95%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.77 (1H, s), 7.31 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.88 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.52 (1H, br.s), 4.36-4.30 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.27 (1H, dd, J = 14.1, 5.4 Hz), 2.89 (3H, s), 2.40-2.31 (1H, m), 2.15-2.12 (1H, m), 1.89-1.85 (1H, m).

ESI-MS m/z: 470 $[M+H]^+$.

[0159] 実施例８３

4-クロロ-N-(エタンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（198 mg, 0.505 mmol）をジクロロメタン（4 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（142 μl, 0.487 × 2 mmol)、エタンスルホニルクロリド（72 μl, 0.487 × 1.5 mmol）を加え、室温まで昇温させながら終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 243 mg, 0.502 mmol, 99%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.70 (1H, s), 7.26 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.84 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.36 (1H, br.s), 4.33-4.27 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.27 (1H, dd, J = 13.8, 5.2 Hz), 2.99-2.89 (2H, m), 2.36-2.31 (1H, m), 2.17-2.13 (1H, m), 1.91-1.83 (1H, m), 1.32 (3H, t, J = 7.4 Hz).

ESI-MS m/z: 484 $[M+H]^+$.

[0160] 実施例８４

4-クロロ-N-(イソプロパンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、イソプロパンスルホニルクロリド（17 μl, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1 N mol/L塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 6 mg, 0.012 mmol, 9%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.65 (1H, s), 7.26-7.23 (1H, m), 6.81 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.08 (1H, br.s), 4.30-4.24 (1H, m), 4.01 (3H, s

OnCusp
Ex. 1038

), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J = 13.5, 5.2 Hz), 3.04-2.97 (1H, m), 2.38-2.33 (1H, m), 2.22-2.11 (1H, m), 1.88-1.83 (1H, m), 1.32 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.27 (3H, d, J = 6.8 Hz).
ESI-MS m/z: 498 $[M+H]^+$.

[0161] 実施例８５

4-クロロ-N-(シクロプロパンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、シクロプロパンスルホニルクロリド (12 μl, 0.128 × 1.2 mmol) を加え、0℃で1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (淡黄色固体, 36 mg, 0.073 mmol, 57%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.83 (1H, s), 7.28 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.85 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.18 (1H, br.s), 4.33-4.27 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.27 (1H, dd, J = 13.7, 5.6 Hz), 2.42-2.30 (2H, m), 2.16-2.13 (1H, m), 1.85-1.81 (1H, m), 1.09-1.05 (1H, m), 0.99-0.96 (1H, m), 0.87-0.79 (2H, m).
ESI-MS m/z: 496 $[M+H]^+$.

[0162] 実施例８６

4-クロロ-N-(イソブタンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、イソブタンスルホニルクロリド (12 μl, 0.128 × 1.2 mmol) を加え、0℃で1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水

で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g,メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 56 mg, 0.109 mmol, 85%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.70 (1H, s), 7.26 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.84 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.18 (1H, d, J = 5.1 Hz), 4.33-4.27 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.57 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J = 14.0, 5.0 Hz), 2.88 (1H, dd, J = 14.0, 6.0 Hz), 2.74 (1H, dd, J = 14.0, 7.0 Hz), 2.38-2.29 (1H, m), 2.25-2.10 (2H, m), 1.88-1.82 (1H, m), 1.03 (3H, d, J = 6.8 Hz), 1.00 (3H, d, J = 6.8 Hz).

ESI-MS m/z: 512 $[M+H]^+$.

[0163] 実施例８７

N-(ベンゼンスルホニル)-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、ベンゼンスルホニルクロリド（20 μl, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、クロロホルムで抽出、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isorela One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 30 mg, 0.056 mmol, 44%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.65-7.63 (2H, m), 7.47 (1H, t, J = 7.4 Hz), 7.37 (2H, t, J = 7.6 Hz), 7.28 (1H, s), 7.17 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.72 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.41 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.16-4.10 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J = 13.2, 4.6 Hz), 2.18-2.03 (2H, m), 1.74-1.71 (1H, m).

ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$.

[0164] 実施例８８

4-クロロ-N-(p-トルエンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン(50 mg, 0.128 mmol)をジクロロメタン(2 mL)に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン(26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、p-トルエンスルホニルクロリド(29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)を加え、0℃で2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム)で精製し、標記の化合物(黄褐色固体, 36 mg, 0.066 mmol, 52%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.51 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.31 (1H, s), 7.18 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.15 (2H, d, J = 7.8 Hz), 6.74 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.30 (1H, d, J = 7.1 Hz), 4.13-4.07 (1H, m), 4.00 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.17-3.15 (1H, m), 2.35 (3H, s), 2.11-2.06 (2H, m), 1.77-1.71 (1H, m).

ESI-MS m/z: 546 $[M+H]^+$.

[0165] 実施例８９

4-クロロ-N-(2-チオフェンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン(172 mg, 0.439 mmol)をジクロロメタン(3.5 mL)に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン(92 μl, 0.439 × 1.5 mmol)、2-チオフェンスルホニルクロリド(121 mg, 0.439 × 1.5 mmol)を加え、室温で終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(Biotage Isorela One, SNAP25 g, メタノール/クロロホルム)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 209 mg, 0.388 mmol, 88%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.46-7.43 (3H, m), 7.22 (1H, d, J = 10

OnCusp
Ex. 1038

.5 Hz), 6.96 (1H, dd, J = 4.9, 3.7Hz), 6.78 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.54 (1H, br.s), 4.23-4.17 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.00 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.21-3.19 (1H, m), 2.14-2.09 (2H, m), 1.83-1.75 (1H, m).

ESI-MS m/z: 538 $[M+H]^+$.

[0166] 実施例９０

4-クロロ-N-(トリフルオロメタンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへピリジン (15 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、トリフルオロメタンスルホニルクロリド (16 μl, 0.128 × 1.2 mmol) を加え、0℃で3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 8 mg, 0.015 mmol, 12%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.00 (1H, br.s), 7.80 (1H, s), 7.35 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.93 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.31-4.28 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.29 (1H, dd, J = 12.7, 5.6 Hz), 2.44-2.37 (1H, m), 2.17-2.11 (2H, m).

ESI-MS m/z: 524 $[M+H]^+$.

[0167] 実施例９１

4-クロロ-N-(エチルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をメタノール-水 (2:1, 1.5 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソシアン酸エチル (20 μl, 0.128 × 2 mmol) を加え、0℃で75分撹拌した。反応液をクロロホルムで抽出、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (B

iotage isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体, 36 mg, 0.078 mmol, 61%）を得た。

^{1}H-NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.79 (1H, s), 7.36 (1H, d, J = 10.6 Hz), 6.92 (1H, d, J = 10.6 Hz), 6.67 (1H, br.s), 4.54-4.49 (1H, m), 4.03 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.63 (3H,s), 3.24-3.15 (2H, m), 3.10-3.06 (1H, m), 2.30-2.27 (1H, m), 2.14-2.07 (1H, m), 1.72-1.65 (1H, m), 1.04 (3H, t, J = 7.2 Hz).

ESI-MS m/z: 463 $[M+H]^+$.

[0168] 実施例９２

4-クロロ-N-（イソプロピルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をメタノール-水（2:1, 1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソシアン酸イソプロピル（25μl, 0.128 × 2 mmol）を加え、0℃で75分撹拌した。反応液をクロロホルムで抽出、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 59 mg, 0.124 mmol, 97%）を得た。

^{1}H-NMR(500MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.94 (1H, s), 7.46 (1H, d, J = 10.9 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.9 Hz), 6.28 (1H, br.s), 4.57-4.53 (1H, m), 4.06 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.84-3.80 (1H, m), 3.62 (3H, s), 3.23 (1H, dd, J = 13.5, 4.9 Hz), 2.34-2.28 (1H, m), 2.12-2.05 (1H, m), 1.79-1.76 (1H, m), 1.08 (3H, d, J = 6.3 Hz), 1.05 (3H, d, J = 6.6 Hz).

ESI-MS m/z: 477 $[M+H]^+$.

[0169] 実施例９３

4-クロロ-N-（ヘキシルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をメタノール-水（2:1, 1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソシア

OnCusp
Ex. 1038

ン酸ヘキシル（37 μl，0.128 × 2 mmol）を加え、0℃で75分撹拌した。反応液をクロロホルムで抽出、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isorela One，SNAP 10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体，53 mg，0.102 mmol，80%）を得た。

^{1}H-NMR(500MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：8.21（1H，s），7.61（1H，d，J = 10.9 Hz），7.15（1H，d，J = 10.9 Hz），6.78（1H，br.s），4.59-4.57（1H，m），4.10（3H，s），3.99（3H，s），3.98（3H，s），3.62（3H，s），3.25（1H，dd，J = 14.3，5.7 Hz），3.18-3.12（1H，m），3.04-2.98（1H，m），2.40-2.32（1H，m），2.07-2.02（1H，m），1.92-1.84（1H，m），1.42-1.39（2H，m），1.26-1.20（4H，m），0.88-0.86（2H，m），0.82（3H，t，J = 6.9 Hz）.

ESI-MS m/z：519 $[M+H]^+$.

[0170] 実施例９４

4-クロロ-N-（フェニルカルバモイル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（200 mg，0.510 mmol）をジクロロメタン（4 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソシアン酸フェニル（110 μl，0.510 × 2 mmol）を加え、0℃で2時間撹拌した。反応液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(Biotage Isolera One，SNAP 25 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体，168 mg，0.329 mmol，65%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：8.19（1H,s），7.48（1H，d，J = 10.7 Hz），7.29-7.26（2H，m），7.16-7.14（2H，m），7.07（1H，d，J = 8.8 Hz），7.03（1H，d，J = 11.2 Hz），6.92-6.90（1H，m），4.73-4.67（1H，m），4.03（3H，s），4.00（3H，s），3.99（3H，s），3.65（3H，s），3.22（1H，dd，J = 13.5，5.2 Hz），2.43-2.33（1H，m），2.12-2.04
（1H，m），1.84-1.80（1H，m）.

ESI-MS m/z：511 $[M+H]^+$.

[0171] 実施例９５

N-(ベンジルカルバモイル)-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をメタノール-水（2:1, 1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソシアン酸ベンジル（32 μl, 0.128 × 2 mmol）を加え、0℃で75分撹拌した。反応液をクロロホルムで抽出、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 37 mg, 0.070 mmol, 55%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.01 (1H, s), 7.39 (1H,d, J = 10.7 Hz), 7.21-7.20 (4H, m), 7.17-7.12 (1H, m), 6.87 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.54 (1H, br.s), 4.64-4.60 (1H, m), 4.59 (1H, d, J = 15.1 Hz), 4.25 (1H, d, J = 15.1 Hz), 3.99 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.21 (1H, dd, J = 13.8, 5.2 Hz), 2.37-2.28 (1H, m), 2.11-2.03 (1H, m), 1.80-1.72 (1H, m).

ESI-MS m/z: 525 ($[M+H]^+$.

[0172] 実施例９６

4-クロロ-N-（ジメチルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解した。そこへトリエチルアミン（26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、ジメチルカルバモイルクロリド（14 μl, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、加熱還流した。4時間後、トリエチルアミン(26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、ジメチルカルバモイルクロリド（14 μl, 0.128 × 1.2 mmol）を追加した。18時間後、さらにトリエチルアミン(26 μl, 0.128 × 1.5 mmol)、ジメチルカルバモイルクロリド（14 μl, 0.128 × 1.2 mmol）を追加した。20時間後、水を加え反応をクエンチした。混合物に飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で

OnCusp
Ex. 1038

精製し、標記の化合物（淡黄色固体，58 mg，0.125 mmol，98%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：7.58（1H，s），7.29（1H，d，J = 10.7 Hz），6.83（1H，d，J = 11.0 Hz），5.03（1H，d，J = 5.9 Hz），4.51-4.45（1H，m），4.00（3H，s），3.98（3H，s），3.95（3H，s），3.64（3H，s），3.25（1H，dd，J = 13.1，4.3 Hz），2.92（6H，s），2.31-2.22（1H，m），2.18-2.14（1H，m），1.77-1.74（1H，m）.

ESI-MS m/z：463 $[M+H]^+$.

[0173] 実施例９７

4-クロロ-N-（ジエチルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（301 mg，0.768 mmol）をジクロロエタン（6 mL）に溶解した。そこへトリエチルアミン（215 μl，0.768 × 2 mmol)、ジエチルカルバミン酸クロリド（146 μl，0.768 ×1.5 mmol）を加え、3時間加熱還流した。反応液を放冷し、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP 25 g，メタノール/クロロホルム)で精製し、標記の化合物（黄色固体，168 mg，0.342 mmol，44%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ [ppm]：7.60（1H，s），7.31（1H，d，J = 10.5 Hz），6.84（1H，d，J = 11.0 Hz），4.85（1H，d，J = 6.3 Hz），4.55-4.49（1H，m），4.01（3H，s），3.98（3H，s），3.96（3H，s），3.64（3H，s），3.36-3.32（2H，m），3.28-3.19（3H，m），2.28-2.23（1H，m），2.17-2.14（1H，m），1.76-1.74（1H，m），1.14（6H，t，J = 7.1 Hz）.

ESI-MS m/z：491 $[M+H]^+$.

[0174] 実施例９８

4-クロロ-N-（モルフォリン-4-カルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg，0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解した。そこへトリエチルアミン（87 μl，0.128 × 5 mmol)、モルフォリン-4-カルボニルクロリド（73 μl，0.128 ×

5 mmol）を加え、5時間加熱還流した。反応液を放冷し、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 30 mg, 0.059 mmol, 46%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.61 (1H, s), 7.33 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.87 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.81 (1H, br.s), 4.55-4.49 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.66 (4H, t, J = 4.9 Hz), 3.64 (3H, s), 3.41 (4H, t, J = 4.5 Hz), 3.24 (1H, dd, J = 13.3, 5.2 Hz), 2.32-2.23 (1H, m), 2.15-2.12 (1H, m), 1.82-1.79 (1H, m).

ESI-MS m/z: 505 $[M+H]^+$.

[0175] 実施例９９

4-クロロ-N-（ピロリジン-1-カルボニル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解した。そこへトリエチルアミン（87 μl, 0.128 × 5 mmol）、ピロリジン-1-カルボニルクロリド（73 μl, 0.128 × 5 mmol）を加え、終夜加熱還流した。反応液を放冷し、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 23 mg, 0.047 mmol, 36%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.24 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.73 (1H, d, J = 7.3 Hz), 4.24-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.52 (3H, s), 3.29-3.24 (2H, m), 3.21-3.15 (2H, m), 3.10 (1H, dd, J = 13.5, 5.0 Hz), 2.10-2.06 (1H, m), 1.97-1.91 (2H, m), 1.79-1.78 (4H, m).

ESI-MS m/z: 489 $[M+H]^+$.

[0176] 実施例１００

4-クロロ-N-（ピペリジン-1-カルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解した。そこへトリエチルアミン（87 μl, 0.128 × 5 mmol)、ピペリジン-1-カルボニルクロリド（80 μl, 0.128 × 5 mmol）を加え、終夜加熱還流した。反応液を放冷し、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 36 mg, 0.072 mmol, 56%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.18 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.00 (1H, d, J = 7.1 Hz), 4.20-4.17 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.29-3.28 (4H, m), 3.10 (1H, dd, J = 13.5, 4.3 Hz), 2.09-2.06 (1H, m), 2.00-1.89 (2H, m), 1.56-1.50 (2H, m), 1.41-1.37 (4H, m).

ESI-MS m/z: 503 $[M+H]^+$.

[0177] 実施例１０１

4-クロロ-N-（トリクロロアセチルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（100 mg, 0.255 mol）をジクロロメタン（5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソシアン酸トリクロロアセチル(48ml, 0.255 × 1.6 mmol）を加え、0℃で20分撹拌した。反応液を濃縮し、得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（赤褐色固体, 19 mg, 0.033 mmol, 13%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.40 (1H, br.s), 8.30 (1H, d, J = 6.3 Hz), 7.42 (1H, s), 7.25 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.81 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.50-4.44 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 12.8, 4.8 Hz), 2.37-2.19 (2H, m), 1.90-1.

87 (1H, m).

ESI-MS m/z: 579 $[M+H]^+$.

[0178] 実施例１０２

4-クロロ-N-(ジメチルアミノアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、N,N-ジメチルグリシン (41 mg, 0.332 × 1.2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (76 mg, 0.332 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (54 mg, 0.332 × 1.2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mol) を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 107 mg, 0.224 mmol, 68%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.58 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.16 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.31-4.28 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 13.2, 5.6 Hz), 2.89 (2H, d, J = 8.3 Hz), 2.21 (6H, s), 2.10-2.06 (1H, m), 1.93-1.92 (1H, m).

ESI-MS m/z: 477 $[M+H]^+$.

[0179] 実施例１０３

4-クロロ-N-(ジメチルアミノアセチル)デアセチルコルヒチン塩酸塩の合成

氷冷下、メタノール (2 mL) にアセチルクロライド (24 ml, 0.224 × 1.5 mmol) を滴下して1時間撹拌した。そこへ4-クロロ-N-ジメチルアミノアセチル-デアセチルコルヒチン (107 mg, 0.224 mmol) のメタノール溶液 (2 ml) を滴下し、0℃で150分撹拌した。反応液を濃縮乾固し、真空乾燥して標記の化合物 (黄褐色固体, 106 mg, 0.206 mmol, 92%) を得た。

OnCusp
Ex. 1038

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.71 (1H, br.s), 9.40 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.16 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.10 (1H, s), 7.05 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.33-4.27 (1H, m), 4.10 (1H, dd, J = 15.4, 4.9 Hz), 3.96-3.88 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.14 (1H, dd, J = 13.1, 5.0 Hz), 2.75 (6H, s), 2.18-2.13 (1H, m), 2.08-1.99 (1H, m), 1.93-1.83 (1H, m).

[0180] 実施例１０４

4-クロロ-N-（ジエチルアミノアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、N,N-ジエチルグリシン (66.9 mg, 0.255 × 2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1.5 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (98 mg, 0.255 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (69 mg, 0.255 × 2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン (100 mg, 0.255 mol) を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (白色固体, 51 mg, 0.101 mmol, 40%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.42 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.13 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.33-4.26 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.32-3.30 (2H, m), 3.10 (1H, dd, J = 13.1, 5.5 Hz), 2.98 (2H, d, J = 8.5 Hz), 2.53 (2H, d, J = 7.1 Hz), 2.15-2.01 (2H, m), 1.94-1.89 (1H, m), 0.99 (6H, t, J = 7.1 Hz).

ESI-MS m/z: 505 $[M+H]^+$.

[0181] 実施例１０５

N-（t-ブチルオキシカルボニルアミノアセチル)-4-クロロデアセチルコルヒ

チンの合成

アルゴン雰囲気下、N-(t-ブチルオキシカルボニル)グリシン（64 mg, 0.306 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（70 mg, 0.306 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（50 mg, 0.306 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（120 mg, 0.306 mol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 153 mg, 0.279 mmol, 94%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.61 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.13 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.10 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.89 (1H, t, J = 6.0 Hz), 4.25-4.24 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.63 (1H, dd, J = 16.8, 6.3 Hz), 3.56-3.54 (1H, m), 3.54 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 12.9, 5.4 Hz), 2.13-2.09 (1H, m), 1.96-1.89 (1H, m), 1.35 (9H, s).

ESI-MS m/z: 549 $[M+H]^+$.

[0182] 実施例１０６

4-クロロ-N-(アミノアセチル)デアセチルコルヒチン トリフルオロ酢酸塩の合成

アルゴン雰囲気下、N-(t-ブチルオキシカルボニルアミノアセチル)-4-クロロ-デアセチルコルヒチン（50 mg, 0.091 mmol）をジクロロメタン（750 μl）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリフルオロ酢酸（291 μl, 3.2 mL/mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液を濃縮乾固し、真空乾燥して、標記の化合物（褐色固体, 88 mg, 定量的）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.10 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.95-7.92

OnCusp
Ex. 1038

(3H, m), 7.16 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.11 (1H, s), 7.05 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.26-4.22 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.69-3.61 (2H, m), 3.53 (3H, s), 3.14 (1H, dd, J = 13.3, 5.0 Hz), 2.17-2.13 (1H, m), 2.05-1.95 (1H, m), 1.88-1.83 (1H, m).

ESI-MS m/z: 449 $[M+H]^+$.

[0183] 実施例１０７

4-クロロ-N-（ピロリジン-1-イルアセチル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、ピロリジン-1-イル酢酸（15.8 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 20 mg, 0.040 mmol, 31%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.52 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.15 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.29-4.26 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.35-3.31 (1H, m), 3.10 (1H, dd, J = 13.7, 6.3 Hz), 3.07 (2H, s), 2.51-2.49 (3H, m), 2.11-2.03 (2H, m), 1.93-1.91 (1H, m), 1.71 (4H, br.s).

ESI-MS m/z: 503 $[M+H]^+$.

HPLC測定条件

[0184] 実施例１０８

4-クロロ-N-（ピペリジン-1-イルアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、ピペリジン-1-イル酢酸（15.8 mg, 0.128 × 1.2 mmol

）をN,N-ジメチルホルムアミド（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 48 mg, 0.093 mmol, 73%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.45 (1H. br.s), 7.14 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.32-4.27 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.38 (1H, dd, J = 13.7, 6.6 Hz), 3.11 (1H, dd, J = 13.5, 5.2 Hz), 2.90 (2H, br.s), 2.37 (3H, br.s), 2.13-2.07 (1H, m), 2.01-1.91 (2H, m), 1.55-1.51 (4H, m), 1.38-1.37 (2H, m).

ESI-MS m/z: 517 $[M+H]^+$.

[0185] 実施例１０９

4-クロロ-N-(3-カルボキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（80 mg, 0.204 mmol）をジメチルスルホキシド（510 μl）に溶解した。そこへN-メチルモルフォリン（88 μl, 0.204 × 5 mmol)、こはく酸無水物（24 mg, 0.204 ×1.1 mmol）を加え、室温で1時間撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、飽和クエン酸水溶液、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 60 mg, 0.122 mmol, 60%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.75 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.16 (1H,

s), 7.13 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.25-4.19 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 13.4, 5.4 Hz), 2.35 (2H, t, J = 6.5 Hz), 2.26 (2H, t, J = 6.6 Hz), 2.12-2.08 (1H, m), 1.97-1.92 (1H, m), 1.87-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 492 $[M+H]^+$.

[0186] 実施例１１０

4-クロロ-N-［3-(メトキシカルボニル)プロピオニル］デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロ-N-(4-カルボキシプロピオニル)-デアセチルコルヒチン（56 mg, 0.114 mmol）をトルエン（2.3 mL）に溶解した。そこへメタノール（570 μl, 5ml/mmol)、トリメチルシリルジアゾメタン（949 μl, 0.096 × 5 mmol, 0.6 M ヘキサン溶液）を加え、室温で1時間撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isorela One, SNAP 10 g,メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体, 34 mg, 0.067 mmol,59%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.52 (1H, s), 7.31 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.86 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.68 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.59-4.53 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.69 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J = 12.7, 4.6 Hz), 2.69-2.52 (4H, m), 2.30-2.11 (2H, m), 1.85-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 506 $[M+H]^+$.

[0187] 実施例１１１

4-クロロ-N-(4-カルボキシブチリル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（100 mg, 0.255 mmol）をジメチルスルホキシド（638 μl）に溶解した。そこへN-メチルモルフォリン（110 μl, 0.225 × 5 mmol)、グルタル酸無水物（32 mg, 0.255 ×1.1

mmol）を加え、室温で40分撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、飽和クエン酸水溶液、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 112 mg, 0.241 mmol, 95%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.87 (1H, s), 7.77 (1H, br.s), 7.44 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.58-4.52 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.27 (1H, dd, J = 13.1, 4.8 Hz), 2.53-2.34 (6H, m), 2.26-2.23 (1H, m), 2.18-2.10 (1H, m), 2.01-2.00 (1H, m).

ESI-MS m/z: 506 $[M+H]^+$.

[0188] 実施例１１２

4-クロロ-N- [4-(メトキシカルボニル)ブチリル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロ-N-(1-カルボキシブチリル)-デアセチルコルヒチン（87 mg, 0.172 mmol）をトルエン(3.4 mL）に溶解した。そこへメタノール（860 μl, 5 mL/mmol)、トリメチルシリルジアゾメタン（1.43 mL, 0.172 × 5 mmol, 0.6 M ヘキサン溶液)を加え、室温で20分撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 67 mg, 0.129 mmol, 75%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.54 (1H, s), 7.33 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.88 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.55 (1H, d, J = 6.6 Hz), 4.59-4.53 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.67 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J = 13.3, 4.3 Hz), 2.40-2.27 (4H, m), 2.25-2.11 (2H, m), 1.95-1.88 (3H, m).

OnCusp
Ex. 1038

ESI-MS m/z: 520 $[M+H]^+$.

[0189] 実施例１１３

N-(trans-1-カルボキシシクロヘキサン-4-イルオキシカルボニル)-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

N-[trans-1-(ベンジルオキシカルボニル)シクロヘキサン-4-イルオキシカルボニル]-4-クロロデアセチルコルヒチン(66 mg, 0.101 mmol)の酢酸エチル(2 mL)溶液に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて10%パラジウム-炭素(7 mg)を添加した。本反応液を室温、水素ガス雰囲気下にて一晩撹拌した後、不溶物をろ去、次いで酢酸エチルにて洗いこんだ。ろ液と洗浄液は合わせて濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 20 mg, 0.0354 mmol, 35%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.50 (1H, s), 7.25 (1H, d, J=6.81 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.10 (1H, d, J=7.6 Hz), 4.51-4.45 (1H, m), 4.36-4.30 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.25 (1H, dd, J=13.3, 4.3 Hz), 2.34-2.12 (3H, m), 2.08-1.96 (4H, m), 1.71-1.64 (1H, m), 1.56-1.46 (2H, m), 1.43-1.28 (2H, m).

ESI-MS m/z: 562 $[M+H]^+$.

[0190] 実施例１１４

4-クロロ-N-(ピリジン-3-イルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

3-ヒドロキシピリジン(50 mg, 0.526 mmol)のジクロロメタン溶液(1.1 mL)に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてピリジン(55 μL, 0.526×1.3 mmol)及びトリホスゲン(156 mg, 0.526 mmol)を添加して、氷冷下、10分間、次いで室温にて3時間撹拌した。反応液を減圧下、濃縮乾固して得た残留物をジクロロメタン(2 mL)に溶かし、ピリジン(18.6μL, 0.0766×3 mmol)及び4-クロロデアセチルコルヒチン(30 mg, 0.0766 mmol)を添加した。本混合液を室温で一晩撹拌した後、クロロホルムと飽和重曹水を添加した。有機層を取り、水層

はさらにクロロホルムにて抽出した。有機層は合わせて無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 32 mg, 0.0629 mmol, 82%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 8.34 (2H, br-s), 7.58 (1H, s), 7.48 (1H, d, J=7.3Hz), 7.26 (2H, br-s), 7.21 (2H, d, J=10.7 Hz), 6.78 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.57 (1H, d, J=6.6 Hz), 4.38-4.32 (1H, m), 3.95 (3H, s), 3.91 (3H, s), 3.91 (3H, s), 3.49 (3H, s), 3.24 (1H, dd, J=13.8, 5.5 Hz), 2.37-2.29 (1H, m), 2.19-2.11 (1H, m), 1.89-1.81 (1H, m).

ESI-MS m/z: 513 $[M+H]^+$.

[0191] 参考例１９

クロロギ酸-3-(ジメチルアミノ)プロピル塩酸塩の合成

3-(ジメチルアミノ)プロピル(500 μL, 4.27 mmol)のアセトニトリル(9 mL)溶液に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリホスゲン(1.27 g, 4.27 mmol)を添加した。本反応液を徐々に室温に戻しながら、一晩撹拌した後、エーテルとヘキサンを加えた。析出物をろ取、エーテル次いでヘキサンで洗浄した後、減圧乾燥して標記の化合物(白色固体, 0.649 g, 3.21 mmol, 75%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 10.82 (1H,s), 4.17 (2H, t, J=6.1 Hz), 3.12-3.07 (2H, m), 2.73 (3H, s), 2.72 (3H, s), 2.08-2.01 (2H, m).

[0192] 実施例１１５

4-クロロ-N-[1-(ジメチルアミノ)プロピル-3-イルオキシカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(30 mg, 0.0766 mmol)のジクロロメタン(2 mL)溶液に、クロロギ酸-3-(ジメチルアミノ)プロピル塩酸塩(100 mg, 0.0766×6.5 mmol)及びピリジン(211μL, 0.0766×16 mmol)を添加して、室温で一晩撹拌した。反応液に酢酸エチル及び飽和重曹水を加えて有機層を取った。有機層は、飽和重曹水次いでブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾

OnCusp
Ex. 1038

燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 13 mg, 0.0249 mmol, 33%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.48 (1H, s), 7.22 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.81 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.60 (1H, br-s), 4.30-4.22 (2H, m), 4.02-3.95 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J=13.7, 4.9 Hz), 3.17-3.10 (2H, m), 2.89 (6H, s), 2.34-2.13 (4H, m), 1.90-1.82 (1H, m).

ESI-MS m/z: 521 $[M+H]^+$.

[0193] 実施例１１６

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸(22 mg, 0.0766×1.5 mmol)のジメチルホルムアミド(1.5 mL)溶液に室温、アルゴンガス雰囲気下にて1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(22 mg , 0.0766×1.5 mmol)次いでヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(18 mg, 0.0766×1.5 mmol)を添加した。本溶液を30分間撹拌した後、4-クロロデアセチルコルヒチン(30 mg, 0.0766 mmol)を添加し、室温で一晩撹拌した。酢酸エチルと飽和重曹水を加えた後、有機層を取った。有機層を飽和重曹水次いでブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(淡黄色固体, 18 mg, 0.0321 mmol, 42%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.48 (1H, s), 7.28 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.22 (1H, t, J=8.2 Hz), 7.05-7.01 (2H, br-m), 6.93-6.86 (1H, br-m), 6.81 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.78-6.73 (1H, br-m), 4.77-4.71 (1H, m), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32-3.27 (5H, m), 2.38-2.19 (2H, m), 2.01-1.97 (4H, m), 1.94-1.86 (1H, m).

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

[0194] 実施例１１７

4-クロロ-N-[4-(4-モルホリニルメチル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 41 mg, 0.0683 mmol, 89%)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに4-(4-モルホリニルメチル)安息香酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.75 (2H, d, J=7.8 Hz), 7.50 (1H, s), 7.36 (2H, d, J=7.8 Hz), 7.30 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.83 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.79-4.73 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.74 (4H, t, J=4.3 Hz), 3.71 (3H, s), 3.56 (2H, s), 3.30 (1H, dd, J=13.2, 4.9 Hz), 2.49 (4H, s), 2.39-2.19 (2H, m), 2.00-1.92 (1H, m).

ESI-MS m/z: 595 $[M+H]^+$.

[0195] 実施例１１８

4-クロロ-N-(ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(30 mg, 0.0766 mmol)のジクロロメタン(1.5 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて、チオホスゲン(6.12 μL, 0.0766×1.05 mmol)及びトリエチルアミン(25.6 μL, 0.0766×2.4 mmol)を添加して、同温度で2時間撹拌した。ジエチルアミン(15.8 μL, 0.0766×2 mmol)を添加した後、室温に徐々に戻しながら一晩撹拌した。反応液に酢酸エチル及び10%クエン酸を添加して、有機層を取った。有機層を飽和重曹水次いでブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 33 mg, 0.0648mmol, 85%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.54 (1H, d, J=6.8Hz), 7.15 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.08 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=11.0 Hz), 5.02-4.95 (1H, m), 3

.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.72-3.64 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=13.5, 5.5 Hz), 2.33-2.24 (1H, m), 2.15-2.07 (1H, m), 2.02-1.95 (1H, m), 1.09 (6H, t, J=7.0 Hz).

ESI-MS m/z: 507 $[M+H]^+$.

[0196] 実施例１１９

4-クロロ-N-(ピロリジン-1-チオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 28 mg, 0.0550 mmol, 72%)を得た。ジエチルアミンの代わりにピロリジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.55 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.12 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.94-4.87 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.58-3.45 (4H, m), 3.12 (1H, dd, J=13.4, 5.1 Hz), 2.25-1.84 (7H, m).

ESI-MS m/z: 505 $[M+H]^+$.

[0197] 実施例１２０

4-クロロ-N-(ピペリジン-1-チオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 28 mg, 0.0536 mmol, 70%)を得た。ジエチルアミンの代わりにピペリジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.85 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.96-4.90 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86-3.76 (4H, m), 3.63 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=13.1, 5.2 Hz), 2.23-1.96 (3H, m), 1.64-1.58 (2H, m), 1.50-1.44 (4H, m).

ESI-MS m/z: 519 $[M+H]^+$.

[0198] 実施例１２１

4-クロロ-N-(モルホリン-4-チオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同

様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 28 mg, 0.0536 mmol, 70%)を得た。ジエチルアミンの代わりにモルホリンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.03 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.92-4.86 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87-3.75 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.59 (4H, t, J=4.8 Hz), 3.12 (1H, dd, J=12.2, 5.1 Hz), 2.21-1.99 (3H, m).

ESI-MS m/z: 521 $[M+H]^+$.

[0199] 実施例１２２

4-クロロ-N-(チオモルホリン-4-チオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 27 mg, 0.0504 mmol, 66%)を得た。ジエチルアミンの代わりにチオモルホリンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.97 (1H, d, J=6.8 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.04 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.95-4.89 (1H, m), 4.21-4.09 (4H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J=12.4, 4.9 Hz), 2.60 (4H, t, J=4.9 Hz), 2.23-2.00 (3H, m).

ESI-MS m/z: 537 $[M+H]^+$.

[0200] 実施例１２３

4-クロロ-N-(1,1-ジオキソチオモルホリン-4-チオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 30 mg, 0.0522 mmol, 68%)を得た。ジエチルアミンの代わりにチオモルホリン 1,1-ジオキシドを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.38 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.04 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.83-4.77 (1H, m),

4.38-4.31 (2H, m), 4.25-4.18 (2H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.28-3.21 (2H, m), 3.15-3.08 (2H, m), 2.17-2.08 (3H, m).

ESI-MS m/z: 569 $[M+H]^+$.

[0201] 実施例１２４

4-クロロ-N-(1-メチルピペラジン-4-チオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 27 mg, 0.0504 mmol, 66%)を得た。ジエチルアミンの代わりに1-メチルピペラジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.98 (1H, d, J=6.8 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.93-4.87 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88-3.77 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=12.6, 4.8 Hz), 2.31 (4H, t, J=4.8 Hz), 2.21-1.97 (3H, m), 2.18 (3H, s).

ESI-MS m/z: 534 $[M+H]^+$.

[0202] 実施例１２５

(S)-4-クロロ-N-(2-アセトキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(100 mg, 0.255 mmol)のジクロロメタン(5 mL)に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて、(S)-2-アセトキシプロピオン酸クロリド(35.5 μL, 0.255×1.1 mmol)及びトリエチルアミン(39.1 μL, 0.255×1.1 mmol)を添加して、徐々に室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 123 mg, 0.243 mmol, 95%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.80 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.93 (1H, q, J=6.7 Hz), 4.27-4.21 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.53 (3H, s), 3.1

3 (1H, dd, J=12.3, 3.8 Hz), 2.16-2.08 (1H, m), 2.02 (3H, s), 1.99-1.90 (2H, m), 1.33 (3H, d, J=6.7 Hz).

ESI-MS m/z: 506 $[M+H]^+$.

[0203] 実施例１２６

(S)-4-クロロ-N-(2-ヒドロキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

(S)-4-クロロ-N-(2-アセトキシプロピオニル)デアセチルコルヒチン(123 mg, 0.250 mmol)のメタノール(2.5 mL)溶液に室温で、ナトリウムメトキシド(3mg, 0.250×0.2 mmol)を加えて、室温で1時間撹拌した。反応液にクロロホルム及びブラインを加えて有機層を取った。有機層は無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 107 mg, 0.231 mmol, 0.231 mmol)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.50 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.16 (1H, s), 7.12 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.58 (1H, d, J=5.4 Hz), 4.29-4.22 (1H, m), 4.02 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.53 (3H,), 3.10 (1H, dd, J=12.4, 6.1 Hz), 2.14-2.06 (2H, m), 1.93-1.84 (1H, m), 1.17 (3H, d, J=6.8 Hz).

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

[0204] 実施例１２７

(R)-4-クロロ-N-(2-アセトキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

(S)-4-クロロ-N-(2-ヒドロキシプロピオニル)デアセチルコルヒチン(100 mg, 0.216mmol)のトルエン(4.3 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて酢酸(14.8 μL, 0.216×1.2 mmol)及びトリフェニルホスフィン(170 mg, 0.216×3 mmol)を添加し、次いでアゾジカルボン酸ジエチル(2.2 mol/L in toluene, 295 μL, 0.216×3 mmol)を滴下した後、徐々に室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法にて精製し、標記の化合物(131 mg)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.76 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.17 (1H, s),

7.12 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.93 (1H, q, J=6.8 Hz), 4.22-4.15 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.14-3.08 (1H, m), 2.15-2.07 (1H, m), 2.03 (3H, s), 1.96-1.88 (2H, m), 1.29 (3H, d, J=6.8 Hz).

ESI-MS m/z: 506 $[M+H]^+$.

[0205] 実施例１２８

(R)-4-クロロ-N-(2-ヒドロキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

(S)-4-クロロ-N-(2-ヒドロキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 42 mg, 0.0905 mmol, 2工程64%)を得た。(S)-4-クロロ-N-(2-アセトキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンの代わりに(R)-4-クロロ-N-(2-アセトキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.48 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.15 (1H, s), 7.12 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.52 (1H, d, J=5.1 Hz), 4.27-4.20 (1H, m), 4.00-3.93 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J=12.7, 5.9 Hz), 2.15-2.04 (2H, m), 1.95-1.85 (1H, m), 1.17 (3H, d, J=6.6 Hz).

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

[0206] 実施例１２９

4-クロロ-N-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 37 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.37 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.17 (1H, s), 7.12 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.49 (1H, s), 4.24-4.17 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.54 (3H, s), 3.10 (1H, dd,

OnCusp
Ex. 1038

J=12.2, 5.4 Hz), 2.18-2.06 (2H, m), 1.94-1.85 (1H, m), 1.21 (3H, s), 1.20 (3H, s).

ESI-MS m/z: 478 $[M+H]^+$.

[0207] 実施例１３０

4-クロロ-N-(3-ヒドロキシ-2,2-ジメチルプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 39 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに3-ヒドロキシ-2,2-ジメチルプロピオン酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_6$) δ[ppm]: 7.65 (1H, br-s), 7.41 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.32 (1H, br-s), 6.95 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.58-4.51 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.70 (1H, d, J=11.0 Hz), 3.64 (3H, s), 3.57 (1H, d, J=11.0 Hz), 2.31-2.09 (2H, m), 1.87-1.79 (1H, m), 1.22 (3H, s), 1.14 (3H, s).

ESI-MS m/z: 492 $[M+H]^+$.

[0208] 実施例１３１

4-クロロ-N-[2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピオニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 30 mg, 0.0589 mmol, 77%)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピオン酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.03 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.15 (1H, s), 7.11 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.01 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.72 (1H, t, J=5.2 Hz), 4.62 (1H, t, J= 5.2 Hz), 4.28-4.21 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.55 (3H, s), 3.48 (2H, d, J=5.4 Hz), 3.43 (2H, dd, J=5.1, 2.2 Hz), 3.10 (1H, dd, J=13.4, 4.9 Hz), 2.15-2.06 (1H, m), 2.02-1.91 (2

H, m), 1.00 (3H, s).

ESI-MS m/z: 508 $[M+H]^+$.

[0209] 実施例１３２

4-クロロ-N-(1-アセチルピペリジン-4-カルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体,27 mg, 0.0492 mmol, 64%)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに1-アセチルピペリジン-4-カルボン酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.61-8.58 (1H, m), 7.12 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.10 (1H, d, J=2.4 Hz), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.35-4.29 (1H, m), 4.24-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.85-3.75 (1H, m), 3.53 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J=13.4, 5.4 Hz), 3.07-2.98 (1H, m), 2.59-2.43 (2H, m), 2.15-2.07 (1H, m), 2.01-1.81 (2H, m), 1.96 (3H, d, J=1.0 Hz), 1.75-1.59 (2H, m), 1.48-1.27 (2H, m).

ESI-MS m/z: 545 $[M+H]^+$.

[0210] 実施例１３３

4-クロロ-N-(1-ベンゾイルピペリジン-4-カルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 42 mg, 0.0684 mmol, 89%)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに1-ベンゾイルピペリジン-4-カルボン酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.63 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.45-7.32 (5H, m), 7.13 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.10 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.50-4.37 (1H, m), 4.25-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.66-3.51 (1H, m), 3.54 (3H, s), 3.14-2.74 (2H, m), 3.11 (1H, dd, J=13.2, 5.4 Hz), 2.57-2.51 (1H, m), 2.15-2.07 (1H, m), 2.01-1

.36 (6H, m).

ESI-MS m/z: 607 $[M+H]^+$.

[0211] 実施例１３４

4-クロロ-N-[1-(tert-ブチルオキシカルボニル)ピペリジン-4-カルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 48 mg, 0.0798 mmol, 62 %)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに1-(tert-ブチルオキシカルボニル)ピペリジン-4-カルボン酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.60 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.13 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.09 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.23-4.17 (1H, m), 3.96-3.86 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J=12.9, 5.4 Hz), 2.79-2.67 (1H, m), 2.53-2.48 (1H, m), 2.43-2.35 (1H, m), 2.15-2.07 (1H, m), 2.00-1.80 (2H, m), 1.64 (2H, dd, J=32.4, 11.2), 1.40-1.24 (2H, m), 1.37 (9H, s).

ESI-MS m/z: 603 $[M+H]^+$.

[0212] 実施例１３５

4-クロロ-N-(ピペリジン-4-カルボニル)デアセチルコルヒチン トリフルオロ酢酸塩の合成

4-クロロ-N-[1-(tert-ブチルオキシカルボニル)ピペリジン-4-カルボニル]デアセチルコルヒチン(30 mg, 0.0797 mmol)のジクロロメタン(1 mL)溶液に、氷冷下、トリフルオロ酢酸(400 μL)を添加して、氷冷下にて5分間、次いで室温で2時間撹拌した。反応液を濃縮乾固した後、残留物にエーテルとヘキサンを加えて超音波処理した。析出物をろ取、ヘキサンによる洗浄、次いで減圧乾燥し、標記の化合物(乳白色固体,27 mg, 0.0433 mmol,87%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.71 (1H, d, J=7.3 Hz), 8.47 (1H, br-s), 8.19 (1H, br-s), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.08 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.25-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3

H, s), 3.55 (3H, s), 3.28 (2H, t, J=12.1 Hz), 3.11 (1H, dd, J=13.4, 4.9 Hz), 2.96-2.83 (2H, m), 2.56-2.48 (1H, m), 2.16-2.07 (1H, m), 2.01-1.77 (4H, m), 1.67-1.57 (2H, m).

ESI-MS m/z: 503 $[M+H]^+$.

[0213] 実施例１３６

4-クロロ-N-[3-(ジメチルアミノメチル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 35 mg, 0.0638 mmol, 83%)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに3-(ジメチルアミノメチル)安息香酸塩酸塩を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.08 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.81-7.78 (2H, m), 7.48-7.41 (2H, m), 7.21 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.53-4.46 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.44 (2H, s), 3.17 (1H, dd, J=12.2, 5.6 Hz), 2.21-1.98 (3H, m), 2.15 (6H, s).

ESI-MS m/z: 553 $[M+H]^+$.

[0214] 参考例２０

3-(トリフェニルメチルオキシ)プロパノールの合成

1,3-プロパンジオール(2.0 mL, 27.6 mmol)のジクロロメタン(140 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にてトリエチルアミン(4.04 mL, 27.6×1.05 mmol)及びトリフェニルメチルクロリド(7.69 g, 27.6 mmol)を添加して、徐々に室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液にクロロホルム及び水を添加して、有機層を取った。有機層は水次いでブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, ヘキサン/酢酸エチル/クロロホルム)にて精製し、標記の化合物(白色固体, 4.59 g, 14.4 mmol, 52%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.45-7.41 (6H, m), 7.33-7.22 (9H, m), 3.

77 (2H, t, J=5.9 Hz), 3.28 (2H, t, J=5.9 Hz), 1.89-1.84 (2H, m).

[0215] 参考例２１

3-(トリフェニルメチルオキシ)プロピオンアルデヒドの合成

塩化オキサリル(862 μL, 6.28×1.6 mmol)のジクロロメタン(15 mL)溶液に、-78℃付近、アルゴンガス雰囲気下にて、ジメチルスルホキシド(1.56 mL, 6.28×3.5 mmol)のジクロロメタン(2.5 mL)溶液を滴下した。-78℃付近で10分間撹拌した後、3-(トリフェニルメチルオキシ)プロパノール(2.00 g, 6.28 mmol)のジクロロメタン(9 mL)溶液を滴下した。-78℃付近で10分間撹拌した後、トリエチルアミン(3.50 mL, 6.28×4 mmol)を滴下した。次いで、ゆっくりと室温に戻し、クロロホルムと水を添加した。有機層を取り、ブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をヘキサンで再結晶して、標記の化合物(白色固体, 1.633 g, 5.16 mmol, 82%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 9.76 (1H, t, J=2.2 Hz), 7.44-7.40 (6H, m), 7.33-7.22 (9H, m), 3.47 (2H, t, J=6.1 Hz), 2.64 (2H, td, J=6.1, 2.2 Hz).

[0216] 参考例２２

3-(トリフェニルメチルオキシ)プロピオン酸の合成

3-(トリフェニルメチルオキシ)プロピオンアルデヒド(1.20 g, 3.79 mmol)のアセトン(19.5 mL)-水(3.8 mL)混液に氷冷下、過マンガンカリウム(0.599 g, 3.79 mmol)を数回に分けて添加した。反応液を室温で2時間撹拌した後、塩酸(1 mol/L)にてpH5付近に調製し、次いで10%チオ硫酸ナトリウムを添加して褐色を消去した。次いでクロロホルム、水及び塩酸(1 mol/L)を添加して、pH2付近に調製し、有機層を取った。水層は再びクロロホルムにて抽出した。有機層は合わせて、ブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物に酢酸エチル(10 mL)を加えて超音波処理した後、ヘキサン(10 mL)を加えて室温で一晩静置した。析出物をろ取、ヘキサンで洗浄、減圧乾燥して、標記の化合物(白色固体, 1.15 g, 3.47 mmol, 92%)

を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.45-7.41 (6H, m), 7.32-7.21 (9H, m), 3.42 (2H, t, J=6.3 Hz), 2.62 (2H, t, J=6.3 Hz).

[0217] 実施例１３７

4-クロロ-N-[3-(トリフェニルメチルオキシ)プロピオニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(ピロリジン-1-イル)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 118 mg, 0.168 mmol, 94%)を得た。3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸の代わりに3-(トリフェニルメチルオキシ)プロピオン酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.78 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.34-7.20 (16H, m), 7.13 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.35-4.28 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.18-3.09 (2H, m), 3.05-2.99 (1H, m), 2.53-2.39 (2H, m), 2.18-2.09 (1H, m), 2.02-1.83 (2H, m).

ESI-MS m/z: 706 $[M+H]^+$.

[0218] 実施例１３８

4-クロロ-N-(3-ヒドロキシプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(トリフェニルメチルオキシ)プロピオニル]デアセチルコルヒチン(95 mg, 0.135 mmol)のメタノール(0.5 mL)溶液に、室温でp-トルエンスルホン酸一水和物(5 mg, 0.135×0.2 mmol)を添加して、5時間撹拌した。反応液を濃縮乾固して、フラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(淡黄色固体, 54 mg, 0.116 mmol, 86%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.59 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.13 (2H, s), 7.12 (2H, d, J=10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.54 (1H, t, J=5.2 Hz), 4.28-4.22 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.57-3.52 (2H, m), 3.53 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J=13.7, 5.1 Hz), 2.35-2.2

3 (2H, m), 2.15-2.06 (1H, m), 1.99-1.80 (2H, m).

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

[0219] 実施例１３９

4-クロロ-N-(メタンスルホニルアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、メタンスルホニル酢酸 (21 mg, 0.128 × 1.2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (21 mg, 0.128 × 1.2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (褐色固体, 17 mg, 0.033 mmol, 29%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.67 (1H, br.s), 7.73 (1H, s), 7.36 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.92 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.63-4.56 (1H, m), 4.15 (1H, d, J = 14.6 Hz), 4.06 (1H, d, J = 14.6 Hz), 4.03 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.63 (3H , s), 3.25 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 3.08 (3H, s), 2.34-2.25 (1H, m), 2.16-2.13 (1H, m), 1.93-1.84 (1H, m).

ESI-MS m/z: 512 ($[M+H]^+$)

[0220] 実施例１４０

4-クロロ-N-[3-(ジメチルアミノ)プロピオニル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、3-ジメチルアミノプロピオン酸塩酸塩 (39 mg, 0.128 × 2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (49 mg, 0.128 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (35 mg

, 0.128 × 2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（乳白色固体, 27 mg, 0.055 mmol, 43%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.64 (1H, d, 7.1 Hz), 7.13 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.43-2.37 (2H, m), 2.31-2.27 (2H, m), 2.11 (3H, s), 2.10-2.08 (1H, m), 1.99-1.90 (1H, m), 1.86-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 491 ([M+H]$^+$)

[0221] 実施例１４１

4-クロロ-N-[3-(ジエチルアミノ)プロピオニル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、3-ジエチルアミノプロピオン酸塩酸塩（47 mg, 0.128 × 2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（49 mg, 0.128 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（35 mg, 0.128 × 2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（乳白色固体, 34 mg, 0.066 mmol, 51%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.70 (1H, d, J = 6.6 Hz), 7.13 (1H, s), 7.12 (1H, d, J= 11.0 Hz), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.26-4.20 (1H,

m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.5, 5.2 Hz), 2.64-2.55 (2H, m), 2.51-2.40 (4H, m), 2.27-2.22 (2H, m), 2.13-2.10 (1H, m), 1.99-1.92 (1H, m), 1.85-1.78 (1H, m), 0.93 (6H, t, J = 6.7 Hz).

ESI-MS m/z: 519 ($[M+H]^+$)

[0222] 実施例１４２

4-クロロ-N-(３－ピペリジノプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、1-ピペリジンプロピオン酸 (40 mg, 0.128 × 2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (49 mg, 0.128 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (35 mg, 0.128 × 2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (白色固体, 20 mg, 0.038 mmol, 29%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.71 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.12 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.43 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.31-2.26 (6H, m), 2.13-2.10 (1H, m), 2.00-1.91 (1H, m), 1.83-1.80 (1H, m), 1.48-1.47 (4H, m), 1.37-1.35 (2H, m).

ESI-MS m/z: 531 ($[M+H]^+$)

[0223] 実施例１４３

N-[N'-(t-ブチルオキシカルボニル)-N'-メチルアミノアセチル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

OnCusp
Ex. 1038

アルゴン雰囲気下、t-ブチルオキシカルボニルサルコシン（96 mg, 0.255 × 2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（98 mg, 0.255 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（69 mg, 0.255 × 2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（100 mg, 0.255 mmol）を加え、室温に戻して90分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 71 mg, 0.126 mmol, 50%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.67, 8.64 (total 1H, each d, J = 7.8 Hz), 7.13 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.11 (1H, s), 7.02 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.29-4.23 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.32-3.30 (2H, m), 3.11 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.74, 2.72 (total 3H, each s), 2.13-2.10 (1H, m), 1.99-1.93 (1H, m), 1.91-1.82 (1H, m), 1.36, 1.29 (total 6H, each s).

ESI-MS m/z: 563 ([M+H]$^+$)

[0224] 実施例１４４

N-[N'-ベンジル-N'-（t-ブチルオキシカルボニル)アミノアセチル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、N-ベンジル-N-t-ブチルオキシカルボニルグリシン（135 mg, 0.255× 2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（98 mg, 0.255 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（69 mg, 0.255 × 2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（100 mg, 0.255 mmol）を加え、室温に戻して90分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水

、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 87 mg, 0.136 mmol, 57%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.64, 8.60 (total 1H, each d, J = 6.8 Hz), 7.36-7.31 (2H, m), 7.28-7.20 (3H, m), 7.15-7.12 (2H, m), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.37-4.19 (3H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.85-3.66 (2H, m), 3.56 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.16-2.07 (1H, m), 1.99-1.91 (1H, m), 1.87-1.79 (1H, m), 1.33 (9H, s).

ESI-MS m/z: 639 ([M+H]$^+$)

[0225] 実施例１４５

4-クロロ-N-(1-メチルピペリジン-4-イルカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、1-メチルピペリジン-4-カルボン酸塩酸塩（46 mg, 0.128 × 2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した. そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（49 mg, 0.128 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（35 mg, 0.128 × 2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して150分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 17 mg, 0.033 mmol, 26%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.54 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.12 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.10 (1H, s), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.24-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.10 (1

H, dd, J = 13.8, 5.5 Hz), 2.76-2.70 (2H, m), 2.17-2.06 (2H, m), 2.11 (3H, s), 1.97-1.92 (1H, m), 1.88-1.77 (3H, m), 1.67-1.64 (1H, m), 1.53-1.48 (3H, m).

ESI-MS m/z: 517 ($[M+H]^+$)

[0226] 実施例１４６

4-クロロ-N-[1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-イルカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-カルボン酸（134 mg,0.255 × 2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（98 mg, 0.255 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（69 mg, 0.255 × 2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（100 mg, 0.255 mmol）を加え、室温に戻して150分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 110 mg,0.173 mmol, 68%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.61 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.36-7.31 (5H, m), 7.13 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.10 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.05 (2H, s), 4.24-4.17 (1H, m), 4.01-3.98 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 13.2, 5.1 Hz), 2.88-2.75 (2H, m), 2.44-2.41 (1H, m), 2.12-2.09 (1H, m), 2.00-1.91 (1H, m), 1.89-1.81 (1H, m), 1.71-1.64 (2H, m), 1.39-1.34 (2H, m).

ESI-MS m/z: 637 ($[M+H]^+$)

[0227] 実施例１４７

4-クロロ-N-(N'-メチルアミノアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロ-N-(N'-t-ブチルオキシカルボニル-N'-メチルアミノアセチル)デアセチルコルヒチン（30 mg, 0.053 mmol）をジクロロメタン（426 μl）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリフルオロ酢酸（171 μl）を加え、0℃で150分撹拌した。反応液を濃縮乾固し、クロロホルムに再溶解して飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。クロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 16 mg, 0.035 mmol, 65%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.66 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.13 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.12 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.31-4.25 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.17 (2H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.7, 3.4 Hz), 2.27 (3H, s), 2.16-2.08 (1H, m), 1.97-1.92 (2H, m).

ESI-MS m/z: 463 ([M+H]$^+$)

[0228] 実施例１４８

N-(N'-ベンジルアミノアセチル)-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロ-N-(N'-ベンジル-N'-t-ブトキシカルボニルアミノアセチル)デアセチルコルヒチン（23 mg, 0.036 mmol）をジクロロメタン（288 μl）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリフルオロ酢酸（115 μl）を加え、0℃で150分撹拌した。反応液を濃縮乾固し、クロロホルムに再溶解して飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。クロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 21 mg, 定量的）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.66 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.34-7.32 (4H, m), 7.26-7.24 (1H, m), 7.14 (1H, s), 7.14 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.04 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.29-4.23 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.71 (2H, s), 3.54 (3H, s), 3.19 (2H, s), 3.11 (1H,

dd, J = 13.3, 4.3 Hz), 2.13-2.10 (1H, m), 1.97-1.89 (2H, m).

ESI-MS m/z: 539 ([M+H]$^+$)

[0229] 実施例１４９

4-クロロ-N-[4-(ジメチルアミノ)ブチリル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ジメチルアミノ酪酸塩酸塩 (43 mg, 0.128 × 2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (49 mg, 0.128 × 2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (35 mg, 0.128 × 2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (淡黄色固体, 35 mg, 0.069 mmol, 54%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.62 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.12 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.5, 5.0 Hz), 2.36-2.34 (2H, m), 2.24 (6H, s), 2.19-2.16 (2H, m), 2.13-2.07 (1H, m), 2.00-1.91 (1H, m), 1.87-1.79 (1H, m), 1.66-1.59 (2H, m).

ESI-MS m/z: 505 ([M+H]$^+$)

[0230] 実施例１５０

4-クロロ-N-[2-(ジメチルアミノ)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、2-(ジメチルアミノ)安息香酸 (25 mg, 0.128 × 1.2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (21 mg, 0.

128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 24 mg, 0.045 mmol, 35%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.54 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.42-7.38 (2H, m), 7.33 (1H, s), 7.17-7.15 (2H, m), 7.06-6.99 (2H, m), 4.52-4.46 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.15 (1H, dd, J = 12.9, 3.7 Hz), 2.70 (6H, s), 2.17-2.14 (1H, m), 2.10-1.98 (2H, m).

ESI-MS m/z: 539 ([M+H]$^+$)

[0231] 実施例１５１

4-クロロ-N-（イソブチルチオカルバモイル）デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸イソブチル（31 μl, 0.128 × 2 mmol）を加え、室温まで昇温させながら4時間撹拌した。反応液に10%クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 26 mg, 0.051 mmol, 40%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.00 (1H, br.s), 7.57 (1H, br.s), 7.14 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.79-4.70 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.21-3.11 (3H, m), 2.15-2.07 (2H, m), 1.84-1.76 (1H, m), 0.84 (6H, d, J = 6.3 Hz).

ESI-MS m/z: 507 ([M+H]+)

[0232] 実施例１５２

N-(ベンジルチオカルバモイル)-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸ベンジル (34 μl, 0.128 × 2 mmol) を加え、室温まで昇温させながら4時間撹拌した。反応液に10% クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (白色固体, 43 mg, 0.079 mmol, 62%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.19 (1H, br.s), 7.97 (1H, br.s), 7.31-7.30 (2H, m), 7.25-7.24 (3H, m), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.04 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.79-4.74 (1H, m), 4.65-4.60 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J = 12.4, 4.6 Hz), 2.18-2.06 (2H, m), 1.93-1.86 (1H, m).

ESI-MS m/z: 541 ([M+H]+)

[0233] 実施例１５３

4-クロロ-N-(シクロヘキシルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸シクロヘキシル (35μl, 0.128 × 2 mmol) を加え、室温に戻して6時間撹拌した。反応液に10% クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (白色固体, 26 mg, 0.049 mmol, 38%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.86 (1H, d, J = 6.6 Hz), 7.48 (1H, br

.s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.78-4.71 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 12.8, 4.5 Hz), 2.12-2.07 (2H, m), 1.88-1.77 (3H, m), 1.66-1.61 (2H, m), 1.53-1.50 (1H, m), 1.25-1.14 (6H, m).

ESI-MS m/z: 533 ($[M+H]^+$)

[0234] 実施例１５４

4-クロロ-N-[(2-ピペリジノエチル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸2-ピペリジノエチル(42 μl, 0.128 × 2 mmol) を加え、室温まで昇温させながら終夜撹拌した。反応液に10% クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 33 mg, 0.059 mmol, 46%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.59 (1H, br.s), 7.94 (1H, br.s), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.75-4.70 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.80-3.74 (2H, m), 3.61 (3H, s), 3.20-3.06 (2H, m), 3.12 (1H, dd, J = 12.7, 4.4 Hz), 2.96-2.81 (2H, m), 2.19-2.02 (2H, m), 1.97-1.88 (1H, m), 1.73-1.61 (4H, m), 1.42-1.33 (1H, m), 1.28-1.25 (3H, m).

ESI-MS m/z: 562 ($[M+H]^+$)

[0235] 実施例１５５

4-クロロ-N-[[2-(4-モルフォリノ)エチル]チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン

酸2-(4-モルフォリノ)エチル（39 μl, 0.128 × 2 mmol）を加え、室温まで昇温させながら終夜撹拌した。反応液に10% クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 35 mg, 0.062 mmol, 49%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.29 (1H, d, J = 6.1 Hz), 7.45 (1H, br.s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.78-4.71 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.59-3.57 (4H, m), 3.51-3.42 (2H, m), 3.12 (1H, dd, J = 12.7, 4.6 Hz), 2.39-2.35 (6H, m), 2.17-2.02 (2H, m), 1.91-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 564 ([M+H]$^+$)

[0236] 実施例１５６

4-クロロ-N-(3-ピリジルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸3-ピリジル（29 μl, 0.128 × 2 mmol）を加え、室温に戻して4時間撹拌した。反応液に10%クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体, 51 mg, 0.097 mmol, 76%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.79 (1H, s), 8.67 (1H, d, J = 6.8 Hz), 8.57 (1H, d, J = 2.2 Hz), 8,28 (1H, d, J = 3.7 Hz), 7.94 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.32 (1H, dd, J = 8.2, 4.8 Hz), 7.17 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.14 (1H, s), 7.05 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.81-4.75 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.61 (3 H, s), 3.17-3.12 (1H, m), 2.19-2.13 (2H, m), 2.06-1.99 (1H, m).

ESI-MS m/z: 528 ([M+H]+)

[0237] 実施例１５７

4-クロロ-N-[p-(ジメチルアミノ)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸p-(ジメチルアミノ) フェニル (43 mg, 0.128 × 2 mmol) を加え、室温に戻して4時間撹拌した。反応液に10% クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 46 mg, 0.081 mmol, 63%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.40 (1H, s), 8.02 (1H, d, J = 6.6 Hz), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.14 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.10 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.68 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.84-4.79 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 12.8, 5.5 Hz), 2.87 (6H, s), 2.13-2.09 (2H, m), 2.03-1.98 (1H, m).

ESI-MS m/z: 570 ([M+H]+)

[0238] 実施例１５８

4-クロロ-N-(4-ニトロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、4-ニトロベンゾイルクロリド (24 mg, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g,

OnCusp
Ex. 1038

メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体，36 mg，0.098 mmol，77%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，$CDCl_3$) δ[ppm]：8.31（1H，d，J = 8.3 Hz），8.07-8.02（2H，m），7.95（2H，d，J = 8.5 Hz），7.64（1H，s），7.41（1H，d，J = 10.7 Hz），6.95（1H，d，J = 10.7Hz），4.80-4.74（1H，m），4.05（3H，s），4.02（3H，s），3.99（3H，s），3.72（3H，s），3.32（1H，dd，J = 13.5，5.5 Hz），2.45-2.36（1H，m），2.22-2.19（1H，m），2.11-2.04（1H，m）.

ESI-MS m/z：541（$[M+H]^+$）

[0239] 実施例１５９

4-クロロ-N-(2-ナフトイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg，0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl，0.128 × 1.1 mmol）、2-ナフトイルクロリド（24 mg，0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP 10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体，42 mg，0.077 mmol，60%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，DMSO-d_6) δ[ppm]：9.26（1H，d，J = 7.1 Hz），8.53（1H，s），8.02-7.97（4H，m），7.65-7.59（2H，m），7.26（1H，s），7.19（1H，d，J = 10.5 Hz），7.06（1H，d，J = 10.7 Hz），4.58-4.52（1H，m），3.95（3H，s），3.90（3H，s），3.89（3H，s），3.63（3H，s），3.19（1H，dd，J = 11.5，4.6 Hz），2.19-2.12（3H，m）.

ESI-MS m/z：546（$[M+H]^+$）

[0240] 実施例１６０

4-クロロ-N-(2-ニトロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、2-ニトロ安息香酸（26 mg，0.128 × 1.2 mmol）をN,N

OnCusp
Ex. 1038

-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 23 mg, 0.043 mmol, 33%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 8.04 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.71-7.63 (3H, m), 7.58-7.56 (1H, m), 7.35 (1H, d, J = 10.2 Hz), 6.88 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.86 (1H, br.s), 4.85-4.79 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.02 (3H, s), 4.02 (3H, s), 3.66 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.7, 5.4 Hz), 2.44-2.34 (1H, m), 2.22-2.18 (1H, m), 1.95-1.81 (1H, m).

ESI-MS m/z: 541 ($[M+H]^+$)

[0241] 実施例１６１

4-クロロ-N-(4-メチルベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、p-トルイル酸（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 28 mg, 0.055 m

OnCusp
Ex. 1038

mol, 43%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.70 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.62 (1H, s), 7.35 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.19 (2H, d, J = 8.1 Hz), 6.90 (1H, br.s), 6.87 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.80-4.74 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.41-2.30 (1H, m), 2.37 (3H, s), 2.24-2.20 (1H, m), 1.96-1.93 (1H, m).

ESI-MS m/z: 510 ([M+H]$^+$)

[0242] 実施例１６２

4-クロロ-N-(4-フェニルベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、4-フェニルベンゾイルクロリド (28 mg, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (淡黄色固体, 40 mg, 0.070 mmol, 55%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.12 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.99 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.80 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.74 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.50 (2H, t, J = 7.6 Hz), 7.41 (1H, t, J = 7.2 Hz), 7.23 (1H, s), 7.18 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.06 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.55-4.49 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.18 (1H, dd, J = 12.0, 4.9 Hz), 2.23-2.06 (3H, m).

ESI-MS m/z: 572 ([M+H]$^+$)

[0243] 実施例１６３

4-クロロ-N-(3,5-ジニトロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、3,5-ジニトロベンゾイルクロリド（30 mg, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 47 mg, 0.080 mmol, 63%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 9.91 (1H, d, J = 5.9 Hz), 8.95 (1H, t, J = 1.8 Hz), 8.63 (2H, s), 7.94 (1H, s), 7.54 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.14 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 4.12 (3H, s), 4.03 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.67 (3H, s), 3.37 (1H, dd, J = 12.2, 2.9 Hz), 2.49-2.42 (2H, m), 2.28-2.19 (1H, m).

ESI-MS m/z: 586 ($[M+H]^+$)

[0244] 実施例１６４

4-クロロ-N-(3,5-ジメチルベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、3,5-ジメチルベンゾイルクロリド（19 μl, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 35mg, 0.067 mmol, 52%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.64 (1H, s), 7.39 (2H, s), 7.36 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.12 (1H, s), 6.88 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.78 (1H, d,

J = 6.8 Hz), 4.80-4.74 (1H, m), 4.01 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.69 (3H, s), 3,32 (1H, dd, J = 13.2, 5.1 Hz), 2.37-2.32 (1H, m), 2.32 (6H, s), 2.26-2.18 (1H, m), 1.98-1.93 (1H, m).

ESI-MS m/z: 524 ($[M+H]^+$)

[0245] 実施例１６５

4-クロロ-N-(3-ニトロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、3-ニトロベンゾイルクロリド (27 mg, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 59 mg, 0.109 mmol,85%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.90 (1H, d, J = 6.1 Hz), 8.57 (1H, s), 8.16 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.96 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.89 (1H, s), 7.47 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.34 (1H, t, J = 7.9 Hz), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 4.07 (3H, s), 4.02 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.33 (1H, dd, J = 13.4, 5.6 Hz), 2.47-2.38 (1H, m), 2.34-2.29 (1H, m), 2.27-2.17 (1H, m).

ESI-MS m/z: 541 ($[M+H]^+$)

[0246] 実施例１６６

4-クロロ-N-(3,5-ジメトキシベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、3,5-ジメトキシベンゾイルクロリド (26 mg, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を

加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 47 mg, 0.085mmol, 66%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.65 (1H, s), 7.38 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.01 (1H, d, J = 7.1 Hz), 6.93 (2H, s), 6.90 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.56 (1H, s), 4.77-4.71 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.79 (6H, s), 3.69 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.3, 5.2 Hz), 2.40-2.30 (1H, m), 2.25-2.17 (1H, m), 2.02-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 556 ($[M+H]^+$)

[0247] 実施例１６７

4-クロロ-N-(2,4-ジメトキシベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した. そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、2,4-ジメトキシベンゾイルクロリド（26 mg, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 33 mg, 0.059mmol, 46%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.29 (1H, d, J = 6.3 Hz), 7.98 (1H, d, J = 8.8 Hz), 7.64 (1H, s), 7.34 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.85 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.54 (1H, dd, J = 8.7, 2.1 Hz), 6.51 (1H, d, J = 2.0 Hz), 4.78-4.71 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.00 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.30 (1H, dd, J = 13.2, 5.1 Hz), 2.40-2.31 (1H, m), 2.26-2.18 (1H, m), 1.93-1.84 (1H, m).

ESI-MS m/z: 556 ([M+H]+)

[0248] 実施例１６８

4-クロロ-N-(2,4,6-トリメチルベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、2,4,6-トリメチルベンゾイルクロリド (21 μl, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して90分撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (白色固体, 28 mg, 0.052 mmol, 41%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.50 (1H, s), 7.29 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.86-6.81 (3H, m), 6.09 (1H, d, J = 7.8 Hz), 4.84-4.78 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.01 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.69 (3H, s), 3.29 (1H ,dd, J = 13.2, 4.4 Hz), 2.33-2.16 (2H, m), 2.26 (9H, s), 1.80-1.73 (1H, m).

ESI-MS m/z: 538 ([M+H]+)

[0249] 実施例１６９

4-クロロ-N-(4-シアノベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (19 μl, 0.128 × 1.1 mmol)、4-シアノベンゾイルクロリド (21 mg, 0.128 × 1 mmol) を加え、室温に戻して1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (白色固体, 51 mg, 0.098 mmol, 77%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 8.45 (1H, d, J = 5.9 Hz), 7.93 (2H, d, J = 8.3 Hz), 7.71 (1H, s), 7.52 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.44 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.98 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.81-4.75 (1H, m), 4.06 (3H, s), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.31 (1H, dd, J = 13.2, 5.6 Hz), 2.44-2.35 (1H, m), 2.24-2.17 (1H, m), 2.16-2.06 (1H, m).

ESI-MS m/z: 521 ($[M+H]^+$)

[0250] 実施例１７０

4-クロロ-N-(3-ヒドロキシ-3-メチルブチリル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、β-ヒドロキシイソ吉草酸 (16 μl, 0.128 × 1.2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (21 mg, 0.128 × 1.2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.128 mmol) を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (白色固体, 33 mg, 0.067 mmol, 52%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.60 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.17 (1H, s), 7.13 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.64 (1H, s), 4.29-4.23 (1H, m),3.92 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3,88 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.2,4.9 Hz), 2.26 (2H, s), 2.15-2.07 (1H, m), 2.01-1.92 (1H, m), 1.89-1.81 (1H, m), 1.12 (3H, s), 1.11 (3H, s).

ESI-MS m/z: 492 ($[M+H]^+$)

[0251] 実施例１７１

4-クロロ-N-[4-(ベンジルオキシ)ブチリル]デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ベンジルオキシ酪酸 (27 μl, 0.128 × 1.2 mmol)

OnCusp
Ex. 1038

をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 36 mg, 0.063 mmol, 50%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.61 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.34-7.30 (4H, m), 7.28-7.24 (1H, m), 7.13 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.12 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.0Hz), 4.46 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.41 (1H, d, J = 12.0 Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3,37 (2H, t, J = 6.5 Hz), 3.10 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.23 (2H, t, J = 6.8 Hz), 2.14-2.06 (1H, m), 1.98-1.88 (1H, m), 1.86-1.78 (1H, m), 1.75-1.68 (2H, m).

ESI-MS m/z: 568 ([M+H]$^+$)

[0252] 実施例１７２

4-クロロ-N-(2-シアノベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、2-シアノ安息香酸（23 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた

OnCusp
Ex. 1038

残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体, 41 mg, 0.079 mmol, 62%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.96 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.72 (1H, d, J = 6.6 Hz), 7.64-7.53 (3H, m), 7.46 (1H, br.s), 7.35 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.89 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.86-4.80 (1H, m), 4.02 (3H, s), 4.01 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.70 (3H, s), 3.32 (1H, dd, J = 13.5, 5.5 Hz), 2.47-2.38 (1H, m), 2.26-2.18 (1H, m), 2.03-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 521 ($[M+H]^+$)

[0253] 実施例１７３

4-クロロ-N-(3-シアノベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（19 μl, 0.128 × 1.1 mmol）、3-シアノベンゾイルクロリド（21 mg, 0.128 × 1 mmol）を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 44 mg, 0.084 mmol, 66%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 8.33 (1H, br.s), 8.14 (1H, s), 7.98 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.67 (2H, s), 7.66-7.65 (2H, m), 7.42-7.40 (1H, m), 7.41 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.95 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.81-4.75 (1H, m), 4.03 (3H, s), 4.01 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.71 (3H, s), 3.33 (1H, dd, J = 12.7, 5.4 Hz), 2.41-2.35 (1H, m), 2.26-2.15 (2H, m).

ESI-MS m/z: 521 ($[M+H]^+$)

[0254] 実施例１７４

4-クロロ-N-(2-エチル-2-ヒドロキシブチリル)デアセチルコルヒチンの合成

OnCusp
Ex. 1038

アルゴン雰囲気下、2-エチル-2-ヒドロキシ酪酸（20 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 38 mg, 0.075 mmol, 59%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.32 (1H ,d, J = 7.8 Hz), 7.22 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.01 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.97 (1H, s), 4.33-4.27 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 12.9, 5.4 Hz), 2.20-2.06 (2H, m), 1.90-1.82 (1H, m), 1.67-1.54 (2H, m), 1.47-1.38 (2H, m), 0.76-0.69 (6H, m).

ESI-MS m/z: 506 ([M+H]$^+$)

[0255] 実施例１７５

4-クロロ-N-(1-ヒドロキシシクロプロパンカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、1-ヒドロキシ-1-シクロプロパンカルボン酸（16 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、

OnCusp
Ex. 1038

溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 28 mg, 0.059 mmol,50%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.66 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.26 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.43 (1H, s), 4.35-4.28 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.51 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.5, 5.5 Hz), 2.25-2.17 (1H, m), 2.14-2.06 (1H, m), 1.94-1.85 (1H, m), 0.96-0.79 (4H, m).

ESI-MS m/z: 476 ([M+H]$^+$)

[0256] 実施例１７６

4-クロロ-N-(3-フェニルベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、3-ビフェニルカルボン酸（30 mg, 0.128 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（29 mg, 0.128 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（21 mg, 0.128 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）を加え、室温に戻して3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 26 mg, 0.045 mmol, 36%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.18 (1H, d, J = 7.3 Hz), 8.18 (1H, t, J = 1.8 Hz), 7.86 (1H, dd, J = 7.8, 1.7 Hz), 7.75-7.73 (1H, m), 7.58 (1H, t, J = 7.7 Hz), 7.53-7.49 (1H, m), 7.44-7.39 (1H, m), 7.24 (1H, s), 7.19 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.06 (1H, d, J = 11.2 Hz), 4.56-4.50 (1H, m), 3.94 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89(3H, s), 3.62 (3H, s), 3.18 (1H, dd, J = 12.6, 4.0 Hz), 2.23-2.08 (3H, m).

ESI-MS m/z: 572 ([M+H]+)

[0257] 実施例１７７

4-クロロ-N-(4-ヒドロキシブチリル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロ-N-(4-ベンジルオキシブチリル)デアセチルコルヒチン（41 mg, 0.072 mmol）をジクロロメタン（500 μl）に溶解し、-78℃に冷却した。そこへボロントリブロミド（1M ジクロロメタン溶液, 72 μl, 0.072 × 1 mmol）を加え、-78℃で30分撹拌した。反応液に飽和重曹水を加えクエンチし、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 14 mg, 0.029 mmol, 41%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.59 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.13 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.46 (1H, t, J = 5.1 Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.34-3.30 (2H, m), 3.10 (1H, dd, J = 13.5, 5.5 Hz), 2.17 (2H, t, J = 7.6 Hz), 2.13-2.06 (1H, m), 1.99-1.90 (1H, m), 1.87-1.79 (1H, m), 1.62-1.54 (2H, m).

ESI-MS m/z: 478 ([M+H]+)

[0258] 実施例１７８

4-ブロモ-N-(t-ブチルオキシカルボニル)コルヒチンの合成

4-ブロモコルヒチン(363 mg, 0.76 mmol)をアセトニトリル(18 mL)に溶解した。そこへジメチルアミノピリジン(93 mg, 0.76×1 mmol)、トリエチルアミン(0.318 mL, 0.76×3 mmol)、二炭酸-ジ-t-ブチル(0.873 mL, 0.76×5 mmol)を加えて7時間加熱還流した。反応後、クエン酸水溶液を加えた。クロロホルム抽出した。飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄土

OnCusp
Ex. 1038

色固体, 338 mg, 76.9%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.21 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.81 (1H, dd, J = 12.2, 5.9 Hz), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.56 (3H, s), 3.20 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.33-2.27 (1H, m), 2.25 (3H, s), 1.91-1.81 (1H, m), 1.49 (9H, s), 1.44-1.38 (1H, m).

ESI-MS m/z: 578 $[M+H]^+$, 580 $[M+2+H]^+$.

[0259] 実施例１７９

4-ブロモ-N-(t-ブチルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-(t-ブチルオキシカルボニル)コルヒチン(324 mg, 0.56 mmol)をメタノール(6.5 mL)に溶解した。そこへ1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液(1.12 mL, 0.56×2 mmol)を加えて室温で5時間攪拌した。飽和食塩水を加えてクロロホルム抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 280 mg, 93.2%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.77 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.20 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.00-3.94 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.08 (1H, dd, J = 13.2, 5.1 Hz), 2.18-2.10 (1H, m), 1.97-1.87 (1H, m), 1.83-1.74 (1H, m), 1.33 (9H, s).

ESI-MS m/z: 536 $[M+H]^+$, 538 $[M+2+H]^+$.

[0260] 実施例１８０

4-ブロモデアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-(t-ブチルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチン(251 mg, 0.47 mmol)にトリフルオロ酢酸(0.663 mL, 0.47×19 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液でpH=14にし、クロロホルム:メタノール=5:1で抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した

。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 185 mg, 90.2%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.65 (1H, s), 7.06 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.99 (1H, d, J = 10.7 Hz), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.56 (3H, s), 3.37-3.34 (1H, m), 3.01 (1H, dd, J = 13.1, 4.8 Hz), 2.19-2.11 (1H, m), 2.09-1.93 (3H, m), 1.49-1.42 (1H, m).

ESI-MS m/z: 436 $[M+H]^+$, 438 $[M+2+H]^+$.

[0261] 実施例１８１

4-ブロモ-N-プロピオニルデアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(37 mg, 0.084 mmol)をジクロロメタン(1.0 mL)に溶解した。そこへプロピオニルクロリド(0.009 mL, 0.084×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.018 mL, 0.084×1.5 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(白色固体, 40 mg, 96.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.55 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.14-7.11 (2H, m), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.24-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.8, 5.0 Hz), 2.23-2.12 (3H, m), 1.99-1.89 (1H, m), 1.84-1.77 (1H, m), 0.95 (3H, t, J = 7.6 Hz).

ESI-MS m/z: 492 $[M+H]^+$, 494 $[M+2+H]^+$.

[0262] 実施例１８２

4-ブロモ-N-(シクロヘキサンカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(39 mg, 0.089 mmol)をジクロロメタン(1.0 mL)に溶解した。そこへシクロヘキサンカルボニルクロリド(0.014 mL, 0.089×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.019 mL, 0.089×1.5 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマト

グラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g,クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(白色固体, 44 mg, 90.5%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.49 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.13-7.10 (2H, m), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.21-4.14 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.4, 5.4 Hz), 2.23-2.14 (2H, m), 1.97-1.89 (1H, m), 1.87-1.78 (1H, m), 1.72-1.60 (5H, m), 1.30-1.19 (5H, m).

ESI-MS m/z: 546 $[M+H]^+$, 548 $[M+2+H]^+$.

[0263] 実施例１８３

4-ブロモ-N-ベンゾイルデアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(34 mg, 0.078 mmol)をジクロロメタン(1.0 mL)に溶解した。そこへベンゾイルクロリド(0.011 mL, 0.078×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.018 mL, 0.078×1.5 mmol)を加えて室温で1時間攪拌した。反応後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 41 mg, 97.3%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.08 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.89-7.87 (2H, m), 7.58-7.55 (1H, m), 7.51-7.47 (2H, m), 7.20 (1H, s), 7.17 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.50-4.44 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J = 13.3, 5.0 Hz), 2.30-2.21 (1H, m), 2.15-1.99 (2H, m).

ESI-MS m/z: 540 $[M+H]^+$, 542 $[M+2+H]^+$.

[0264] 実施例１８４

4-ブロモ-N-(フェニルアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(51 mg, 0.117 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへフェニルアセチルクロリド(0.019 mL, 0.117×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.024 mL, 0.117×1.5 mmol)を加えて室温で1時間攪拌した。反応後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ

ィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 66 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.89 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.28-7.18 (5H, m), 7.16 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.23-4.16 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.49 (3H, s), 3.48 (2H, s), 3.12 (1H, dd, J = 13.4, 5.4 Hz), 2.25-2.16 (1H, m), 2.01-1.82 (2H, m).

ESI-MS m/z: 554 $[M+H]^+$, 556 $[M+2+H]^+$.

[0265] 実施例１８５

N-アリル-4-ブロモ-N-(t-ブチルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-(t-ブチルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチン(158 mg, 0.29 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド (3.2 mL)に溶解した。そこへ50%水素化ナトリウム(28 mg, 0.29×2 mmol)、アリルブロミド(0.074 mL, 0.29×3 mmol)を加えて、室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去し、水を加えてクロロホルム抽出した。飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 75 mg, 44.9%)を得た。

ESI-MS m/z: 576 $[M+H]^+$, 578 $[M+2+H]^+$.

[0266] 実施例１８６

4-ブロモ- N-(トリフルオロアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(40 mg, 0.09 mmol)をジクロロメタン(1.0 mL)に溶解した。そこへトリフルオロ無水酢酸(0.015 mL, 0.09×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.019mL, 0.09×1.5 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 41 mg, 85.6%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 10.17 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.17 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.07 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.03 (1H, s), 4.31-4.25 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.18-3.13 (1H, m), 2.27-2.19 (1H, m), 2.09-2.03 (2H, m).

ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$, 534 $[M+2+H]^+$.

[0267] 実施例１８７

N-(アセトキシアセチル)-4-ブロモデアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(100 mg, 0.23 mmol)をジクロロメタン(2.5 mL)に溶解した。そこへアセトキシアセチルクロリド(0.030 mL, 0.23×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.048 mL, 0.23×1.5 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 145 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.80 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.14-7.10 (2H, m), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.50 (2H, s), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J = 13.7, 4.4 Hz), 2.24-2.16 (1H, m), 2.05 (3H, s), 1.99-1.83 (2H, m).

ESI-MS m/z: 536 $[M+H]^+$, 538 $[M+2+H]^+$.

[0268] 実施例１８８

4-ブロモ-N-(2-ピリジンカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(46 mg, 0.105 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへ2-ピリジンカルボニルクロリド塩酸塩(22 mg, 0.105×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.022 mL, 0.105×1.5 mmol)を加えて室温で3時間攪拌した。反応後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 42 mg, 73.9%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.56 (1H, d, J = 7.8 Hz), 8.74 (1H,

OnCusp
Ex. 1038

dq, J = 4.8, 0.9 Hz), 7.99 (1H, td, J = 7.7, 1.4 Hz), 7.93 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.65 (1H, ddd, J = 7.7, 4.8, 1.4 Hz), 7.21 (1H, s), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.53-4.47 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.16 (1H, dd, J = 13.5, 6.0 Hz), 2.37-2.21 (2H, m), 2.03-1.94 (1H, m).

ESI-MS m/z: 542 $[M+H]^+$, 544 $[M+2+H]^+$.

[0269] 実施例１８９

N-アリル-4-ブロモデアセチルコルヒチンの合成

N-アリル-4-ブロモ-N-(t-ブチルオキシカルボニル)デアセチルコルヒチン(90 mg, 0.156 mmol)にトリフルオロ酢酸(0.22 mL, 0.156×19 mmol)を加えて室温で1時間攪拌した。クロロホルムを加えて、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH=14にした。クロロホルム:メタノール=5:1で抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 39 mg, 52.5%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.56 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.01 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.71 (1H, ddd, J = 22.0, 10.6, 6.2 Hz), 4.98 (1H, dd, J = 17.3, 1.7 Hz), 4.92 (1H, dd, J = 10.6, 1.7 Hz), 3.89 (6H, s), 3.85 (3H, s), 3.48 (3H, s), 3.14-3.08 (1H, m), 3.06-3.00 (2H, m), 2.86-2.79 (1H, m), 2.61-2.56 (1H, m), 2.18-2.00 (2H, m), 1.56-1.49 (1H, m).

ESI-MS m/z: 477 $[M+H]^+$, 479 $[M+2+H]^+$.

[0270] 実施例１９０

N-(ベンジルオキシカルボニル)-4-ブロモデアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(63 mg, 0.144 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。ベンジルオキシカルボニルクロリド(0.025 mL, 0.144×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.030 mL, 0.144×1.5 mmol)を加えて室温で1晩攪拌した。反応後、溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフ

ィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 18 mg, 21.9%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.23 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.37-7.30 (5H, m), 7.21 (1H, s), 7.13 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.04 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.98 (2H, d, J = 5.9 Hz), 4.07-4.01 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.52 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 13.3, 5.2 Hz), 2.21-2.12 (1H, m), 2.03-1.93 (1H, m), 1.84-1.77 (1H, m).

ESI-MS m/z: 571 $[M+H]^+$, 573 $[M+2+H]^+$.

[0271] 実施例１９１

4-ブロモ-N-[(メチルチオ)アセチル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(126 mg, 0.29 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(2.5 mL)に溶解し、氷冷した。そこへメチルチオ酢酸(0.030 mL, 0.29×1.2 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(67 mg, 0.29×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(47 mg, 0.29×1.2 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1 mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 112 mg, 73.6%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.77 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.16 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.24-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.15-3.13 (1H, m), 3.11 (2H, d, J = 6.8 Hz), 2.25-2.16 (1H, m), 2.06 (3H, s), 2.01-1.91 (1H, m), 1.88-1.80 (1H, m).

ESI-MS m/z: 525 $[M+H]^+$, 527 $[M+2+H]^+$.

[0272] 実施例１９２

4-ブロモ-N-[(N',N'-ジメチルアミノ)アセチル]デアセチルコルヒチンの合成

OnCusp
Ex. 1038

4-ブロモデアセチルコルヒチン(124 mg, 0.28 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(2.5 mL)に溶解し、氷冷した。そこへN,N-ジメチルアミノ酢酸(35 mg, 0.28×1.2 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(65 mg, 0.28×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(46 mg, 0.28×1.2 mmol)を加えて室温で2.5時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1 mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g,クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 109 mg, 74.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.58 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.15 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.30-4.24 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.4, 5.1 Hz), 2.94-2.84 (2H, m), 2.21 (6H, s), 2.18-2.14 (1H, m), 2.06-1.98 (1H, m), 1.94-1.85 (1H, m).

ESI-MS m/z: 522 $[M+H]^+$, 524 $[M+2+H]^+$.

[0273] 実施例１９３

4-ブロモ-N-プロピルデアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(96 mg, 0.22 mmol)をメタノール(2.0 mL)に溶解し、プロピオンアルデヒド(0.017 mL, 0.22×1.1 mmol)、オルトギ酸トリメチル(0.041 mL, 0.22×1.5 mmol)を加えて室温で1時間攪拌した。氷冷し、水素化ホウ素ナトリウム(12 mg, 0.22×1.5 mmol)を加えて室温で1時間攪拌した。水を加えて、クロロホルム抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 43 mg, 40.9%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.56 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.01 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H,

OnCusp
Ex. 1038

s), 3.50 (3H, s), 3.07-3.01 (2H, m), 2.34-2.20 (2H, m), 2.18-2.01 (3H, m), 1.54-1.47 (1H, m), 1.39-1.30 (2H, m), 0.81 (3H, t, J = 7.3 Hz).

ESI-MS m/z: 479 $[M+H]^+$, 481 $[M+2+H]^+$.

[0274] 実施例１９４

4-ブロモ-N-(ヘキシルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(68 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解し、ヘキシルイソシアネート(0.047 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で3時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 80 mg, 88.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.18 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.66 (1H, d, J = 7.6 Hz), 5.92 (1H, t, J = 5.7 Hz), 4.13-4.07 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.52 (3H, s), 3.09 (1H, dd, J = 13.5, 5.5 Hz), 2.97-2.83 (2H, m), 2.21-2.13 (1H, m), 2.00-1.91 (1H, m), 1.71-1.64 (1H, m), 1.31-1.17 (8H, m), 0.83 (3H, t, J = 6.7 Hz).

ESI-MS m/z: 564 $[M+H]^+$, 566 $[M+2+H]^+$.

[0275] 実施例１９５

4-ブロモ-N-(フェニルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(71 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解し、フェニルイソシアネート(0.035 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で4時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 74 mg, 83.3%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.55 (1H, s), 7.32-7.29 (2H, m), 7.25 (1H, s), 7.20-7.13 (3H, m), 7.04 (1H, d, J = 11.2 Hz), 7.00 (1H, d, J = 7.3 Hz), 6.88 (1H, t, J = 7.3 Hz), 4.21-4.15 (1H, m), 3.92 (3H,

OnCusp
Ex. 1038

s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.56 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J = 13.8, 5.2 Hz), 2.26-2.18 (1H, m), 2.11-2.01 (1H, m), 1.81-1.74 (1H, m).

ESI-MS m/z: 556 $[M+H]^+$, 558 $[M+2+H]^+$.

[0276] 実施例１９６

4-ブロモ-N-(ヒドロキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

N-(アセトキシアセチル)-4-ブロモデアセチルコルヒチン(58 mg, 0.11 mmol)をメタノール(1.2 mL)、ジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへナトリウムメトキシド(12 mg, 0.11×2 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 31 mg, 57.0%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.54 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.16 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.03 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.54 (1H, t, J = 5.9 Hz), 4.33-4.26 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.85-3.82 (2H, m), 3.83-3.80 (2H, m), 3.53 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.9, 5.6 Hz), 2.23-2.15 (1H, m), 2.11-2.04 (1H, m), 1.93-1.85 (1H, m).

ESI-MS m/z: 495 $[M+H]^+$, 497 $[M+2+H]^+$.

[0277] 実施例１９７

4-ブロモ-N-(イソブタンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(57 mg, 0.13 mmol)をジクロロメタン(1.0 mL)に溶解した。そこへイソブタンスルホニルクロリド(0.02 mL, 0.13×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.027 mL, 0.13×1.5 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応後、1 mol/L塩酸を加えてクロロホルム抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 39 mg, 53.9%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.11 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.43 (1H,

OnCusp
Ex. 1038

s), 7.12 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04 (1H, d, J = 10.7 Hz), 3.91 (3H, s), 3.91-3.90 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.48 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 13.9, 4.6 Hz), 2.73 (2H, dd, J = 6.3, 2.2 Hz), 2.19-2.11 (1H, m), 2.07-1.94 (2H, m), 1.85-1.78 (1H, m), 0.90 (6H, dd, J = 6.8, 2.2 Hz).

ESI-MS m/z: 557 $[M+H]^+$, 559 $[M+2+H]^+$.

[0278] 実施例１９８

4-ブロモ-N-トシルデアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(60 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへトシルクロリド(32 mg, 0.14×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.029 mL, 0.14×1.5 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、1 mol/L塩酸を加えてクロロホルム抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 75 mg, 90.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.50 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.39 (1H, s), 7.37 (1H, s), 7.23 (1H, s), 7.22 (1H, s), 7.21 (1H, s), 7.08 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.98 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.92 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.51-3.48 (1H, m), 2.93 (1H, dd, J = 13.9, 5.6 Hz), 2.31 (3H, s), 2.09-2.00 (1H, m), 1.71-1.63 (1H, m), 1.55-1.48 (1H, m).

ESI-MS m/z: 591 $[M+H]^+$, 593 $[M+2+H]^+$.

[0279] 実施例１９９

4-ブロモ-N-(2-チオフェンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(66 mg, 0.15 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへ2-チオフェンスルホニルクロリド(33 mg, 0.15×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.031 mL, 0.15×1.5 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、1 mol/L塩酸を加えてクロロホルム抽出した。無水硫酸マグ

ネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 76 mg, 87.0%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.83 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.84 (1H, dd, J = 4.9, 1.5 Hz), 7.30 (1H, dd, J = 3.8, 1.5 Hz), 7.27 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05-7.00 (2H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.71-3.64 (1H, m), 3.52 (3H, s), 2.99 (1H, dd, J = 13.5, 5.5 Hz), 2.14-2.05 (1H, m), 1.78-1.58 (2H, m).

ESI-MS m/z: 583 $[M+H]^+$, 585 $[M+2+H]^+$.

[0280] 実施例２００

4-ブロモ-N-(2,4-ジフルオロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.14 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.3 mL)に溶解し、氷冷した。そこへ2,4-ジフルオロ安息香酸(27 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.14×1.2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、水、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 41 mg, 50.8%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.12 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.62 (1H, dd, J = 15.1, 8.3 Hz), 7.39 (1H, td, J = 10.0, 2.1 Hz), 7.24 (1H, s), 7.20 (1H, dd, J = 8.3, 2.4 Hz), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.44-4.38 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.15 (1H, dd, J = 13.3, 4.8 Hz), 2.28-2.20 (1H, m), 2.08-1.94 (2H, m).

ESI-MS m/z: 577 $[M+H]^+$, 578 $[M+2+H]^+$.

[0281] 実施例２０１

4-ブロモ-N-[3-(N',N'-ジメチルアミノ)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(63 mg, 0.144 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.3 mL)に溶解し、氷冷した。そこへ3-(N,N-ジメチルアミノ)安息香酸(29 mg, 0.144×1.2 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.144×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.144×1.2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、水、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g,クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 75 mg, 89.3%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.94 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.28 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.20-7.13 (4H, m), 7.05 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.89 (1H, dd, J = 7.9, 2.3 Hz), 4.49-4.43 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J = 13.1, 4.8 Hz), 2.92 (6H, s), 2.29-2.21 (1H, m), 2.16-1.98 (2H, m).

ESI-MS m/z: 584 $[M+H]^+$, 586 $[M+2+H]^+$.

[0282] 実施例２０２

4-ブロモ-N-(2-フルオロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(46 mg, 0.11 mmol)をジクロロメタン(1.0 mL)に溶解した。そこへ2-フルオロベンゾイルクロリド(0.016 mL, 0.11×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.023 mL, 0.11×1.5 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 56 mg, 91.2%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.13 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.58-7.52

(2H, m), 7.34-7.29 (2H, m), 7.27 (1H, s), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.45-4.39 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.17-3.13 (1H, m), 2.28-2.20 (1H, m), 2.07-1.95 (2H, m).

ESI-MS m/z: 559 $[M+H]^+$, 561 $[M+2+H]^+$.

[0283] 実施例２０３

4-ブロモ-N-(3-メトキシベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(48 mg, 0.11 mmol)をジクロロメタン(1.0 mL)に溶解した。そこへ3-メトキシベンゾイルクロリド(0.018 mL, 0.11×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.023 mL, 0.11×1.5 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 63 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.05 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.49 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.43-7.39 (2H, m), 7.19 (1H, s), 7.17 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.13 (1H, dd, J = 8.3, 2.4 Hz), 7.05 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.49-4.43 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.80 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J = 13.9, 4.9 Hz), 2.30-2.21 (1H, m), 2.15-2.01 (2H, m).

ESI-MS m/z: 571 $[M+H]^+$, 573 $[M+2+H]^+$.

[0284] 実施例２０４

4-ブロモ-N-(エチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(68 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへエチルイソチオシアネート(0.028 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で4時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotagelsolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 33 mg, 39.4%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.97 (1H, br s), 7.52 (1H, br s), 7.

14 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.79-4.70 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.41-3.27 (2H, m), 3.12 (1H, dd, J = 13.3, 5.7 Hz), 2.25-2.17 (1H, m), 2.09-1.81 (2H, m), 1.05 (3H, t, J = 7.1 Hz).

ESI-MS m/z: 524 $[M+H]^+$, 526 $[M+2+H]^+$.

[0285] 実施例２０５

4-ブロモ-N-(フェニルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(68 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへフェニルイソチオシアネート(0.038 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で5時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 97 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.70 (1H, br s), 8.43 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.46 (1H, s), 7.44 (1H, s), 7.32-7.28 (2H, m), 7.17-7.03 (4H, m), 4.80-4.74 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.15 (1H, dd, J = 13.1, 4.8 Hz), 2.28-2.09 (2H, m), 2.02-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 572 $[M+H]^+$, 574 $[M+2+H]^+$.

[0286] 実施例２０６

4-ブロモ-N-(N',N'-ジエチルカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(113 mg, 0.26 mmol)を1,2-ジクロロエタン(2.2 mL)に溶解した。そこへジエチルカルバモイルクロリド(0.049 mL, 0.26×1.5 mmol)、トリエチルアミン(0.072 mL, 0.26×2 mmol)を加えて3時間加熱還流した。反応後、1 mol/L塩酸を加えてクロロホルム抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 51 mg, 36.6%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.21 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 10.7

Hz), 7.01 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.76 (1H, d, J = 7.6 Hz), 4.25-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.29-3.15 (4H, m), 3.11 (1H, dd, J = 13.7, 5.1 Hz), 2.21-2.12 (1H, m), 2.04-1.96 (1H, m), 1.93-1.85 (1H, m), 1.00 (6H, t, J = 7.0 Hz).

ESI-MS m/z: 536 $[M+H]^+$, 538 $[M+2+H]^+$.

[0287] 実施例２０７

4-ブロモ-N-(ピペリジン-１-イルカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(107 mg, 0.25 mmol)を1,2-ジクロロエタン(2.1 mL)に溶解した。そこへ1-ピペリジンカルボニルクロリド(0.047 mL, 0.25×1.5 mmol)、トリエチルアミン(0.070 mL, 0.25×2 mmol)を加えて3時間加熱還流した。反応後、1 mol/L塩酸を加えてクロロホルム抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 105 mg, 76.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.18 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.03-6.98 (2H, m), 4.20-4.13 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.30-3.24 (4H, m), 3.10 (1H, dd, J = 13.9, 3.7 Hz), 2.21-2.12 (1H, m), 1.98-1.85 (2H, m), 1.55-1.50 (2H, m), 1.42-1.36 (4H, m).

ESI-MS m/z: 548 $[M+H]^+$, 550 $[M+2+H]^+$.

[0288] 実施例２０８

4-ブロモ-N-(3-ヒドロキシ-2,2-ジメチルプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

ヒドロキシピバル酸(20 mg, 0.14×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.4 mL)に溶解した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.14×1.2 mmol)を加えて室温で30分攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.14 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反

応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 79 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.02 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.13-7.10 (2H, m), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.80 (1H, t, J = 5.4 Hz), 4.25-4.19 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.42-3.34 (2H, m), 3.11 (1H, dd, J = 13.5, 5.0 Hz), 1.07 (3H, s), 1.00 (3H, s).

ESI-MS m/z: 537 $[M+H]^+$, 539 $[M+2+H]^+$.

[0289] 実施例２０９

4-ブロモ-N-(2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオニル)デアセチルコルヒチンの合成

2-ヒドロキシイソ酪酸(18 mg, 0.14×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.4 mL)に溶解した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.14×1.2 mmol)を加えて室温で30分攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.14 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 79 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.38 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.17 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.49 (1H, s), 4.22-4.15 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 12.8, 5.7 Hz), 2.23-2.08 (2H, m), 1.94-1.8

3 (1H, m), 1.21 (3H, s), 1.20 (3H, s).

ESI-MS m/z: 523 $[M+H]^+$, 525 $[M+2+H]^+$.

[0290] 実施例２１０

4-ブロモ-N-(2-エチル-2-ヒドロキシブチリル)デアセチルコルヒチンの合成

2-エチル-2-ヒドロキシ酪酸(23 mg, 0.14×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.4mL)に溶解した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.14×1.2 mmol)を加えて室温で30分攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.14 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage IsoleraOne, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 68 mg,88.2%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.32 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.22 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.01 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.97 (1H, s), 4.32-4.25 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 12.7, 5.6 Hz), 2.23-2.11 (2H, m), 1.89-1.79 (1H, m), 1.65-1.56 (2H, m), 1.47-1.38 (2H, m), 0.76-0.69 (6H, m).

ESI-MS m/z: 551 $[M+H]^+$, 553 $[M+2+H]^+$.

[0291] 実施例２１１

4-ブロモ-N-(1-ヒドロキシシクロプロパンカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

1-ヒドロキシ-1-シクロプロパンカルボン酸(17 mg, 0.14×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.4 mL)に溶解した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.14×1.2 mmol)を加えて室温で1時間攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(62mg, 0.14 mmol)を加えて室

温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 67 mg, 92.0%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.66 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.25 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.43 (1H, s), 4.32-4.26 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.51 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 12.6, 6.0 Hz), 2.23-2.15 (2H, m), 1.94-1.84 (1H, m), 0.95-0.79 (4H, m).

ESI-MS m/z: 521 $[M+H]^+$, 523 $[M+2+H]^+$.

[0292] 実施例２１２

4-ブロモ-N-[2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピオニル]デアセチルコルヒチンの合成

2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロピオン酸 (23 mg, 0.14×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.4 mL)に溶解した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.14×1.2 mmol)を加えて室温で1時間攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(62mg, 0.14 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 74 mg, 95.6%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.02 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.15 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.01 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.73 (1H, t, J = 5.2 Hz), 4.62 (1H, t, J = 5.4 Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.48 (2H, d, J = 5.4 H

z), 3.43 (2H, dd, J = 5.2, 2.6 Hz), 3.14-3.08 (1H, m), 2.23-2.15 (1H, m), 1.98-1.90 (2H, m), 1.00 (3H, s).

ESI-MS m/z: 553 $[M+H]^+$, 555 $[M+2+H]^+$.

[0293] 実施例２１３

4-ブロモ-N-(3-ヒドロキシ-3-メチルブチリル)デアセチルコルヒチンの合成

β-ヒドロキシイソ吉草酸(41 mg, 0.29×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.8 mL)に溶解した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(67 mg, 0.29×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(47 mg, 0.29×1.2 mmol)を加えて室温で30分攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(127 mg, 0.29 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage IsoleraOne, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 153 mg, 98.4%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.59 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.17 (1H, s), 7.12 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.63 (1H, s), 4.27-4.21 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 13.7, 4.9 Hz), 2.26 (2H, s), 2.24-2.15 (1H, m), 2.00-1.90 (1H, m), 1.87-1.79 (1H, m), 1.12 (6H, d, J = 3.7 Hz).

ESI-MS m/z: 537 $[M+H]^+$, 539 $[M+2+H]^+$.

[0294] 実施例２１４

4-ブロモ-N-[4-(ベンジルオキシ)ブチリル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ベンジルオキシ酪酸(0.060 mL, 0.28×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.2 mL)に溶解した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(65 mg, 0.28×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(46 mg, 0.28×1.2 mmol)を加えて室温で30分攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(124 mg, 0.28 mmol)を加えて室温で一晩攪拌し

た。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage IsoleraOne, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 155 mg, 90.4%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.60 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.34-7.25 (5H, m), 7.13-7.11 (2H, m), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.44 (2H, dd, J = 17.4, 12.1 Hz), 4.24-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.37 (2H, t, J = 6.3 Hz), 3.11 (1H, dd, J = 14.1, 4.9 Hz), 2.25-2.21 (2H, m), 2.19-2.14 (1H, m), 1.97-1.88 (1H, m), 1.84-1.78 (1H, m), 1.76-1.68 (2H, m).

ESI-MS m/z: 613 $[M+H]^+$, 615 $[M+2+H]^+$.

[0295] 実施例２１５

4-ブロモ-N-(3-ニトロベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(67 mg, 0.15 mmol)をジクロロメタン(0.7 mL)に溶解した。そこへ3-ニトロベンゾイルクロリド(34 mg, 0.15×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.031 mL, 0.15×1.5 mmol)を加えて室温で3時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 77 mg, 87.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.46 (1H, d, J = 7.1 Hz), 8.77 (1H, t, J = 2.0 Hz), 8.42 (1H, dq, J = 8.2, 1.0 Hz), 8.32 (1H, d, J = 7.9 Hz), 7.81 (1H, t, J = 7.9 Hz), 7.19-7.17 (2H, m), 7.06 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.53-4.46 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.21-3.17 (1H, m), 2.33-2.24 (1H, m), 2.15-2.08 (2H, m).

ESI-MS m/z: 586 $[M+H]^+$, 588 $[M+2+H]^+$

[0296] 実施例２１６

OnCusp
Ex. 1038

4-ブロモ-N-(4-シアノベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(0.6 mL)に溶解した。そこへ4-シアノベンゾイルクロリド(28 mg, 0.14×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.029 mL, 0.14×1.5 mmol)を加えて室温で3時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 72 mg, 90.9%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.32 (1H, d, J = 7.1 Hz), 8.05-7.98 (4H, m), 7.19-7.16 (2H, m), 7.06 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.49-4.43 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.20-3.15 (1H, m), 2.30-2.22 (1H, m), 2.12-2.05 (2H, m).

ESI-MS m/z: 566 $[M+H]^+$, 568 $[M+2+H]^+$

[0297] 実施例２１７

4-ブロモ-N-(3,5-ジメチルベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(65 mg, 0.15 mmol)をジクロロメタン(0.7 mL)に溶解した。そこへ3,5-ジメチルベンゾイルクロリド(30 mg, 0.15×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.031 mL, 0.15×1.5 mmol)を加えて室温で3時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 56 mg, 65.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.99 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.50 (2H, s), 7.19-7.15 (3H, m), 7.05 (1H, d, J = 11.2 Hz), 4.48-4.42 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J = 13.5, 5.2 Hz), 2.32 (6H, s), 2.29-2.21 (1H, m), 2.16-1.97 (2H, m).

ESI-MS m/z: 569 $[M+H]^+$, 571 $[M+2+H]^+$

[0298] 実施例２１８

4-ブロモ-N-(4-メチルベンゾイル)デアセチルコルヒチンの合成

p-トルイル酸(23 mg, 0.14×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.4 mL)に溶解した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.14×1.2 mmol)を加えて室温で30分攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.14 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1 mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 61 mg, 78.6%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.99 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.80 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.29 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.19 (1H, s), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.49-4.43 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J = 13.4, 5.4 Hz), 2.36 (3H, s), 2.29-2.21 (1H, m), 2.15-1.97 (2H, m).

ESI-MS m/z: 555 $[M+H]^+$, 557 $[M+2+H]^+$

[0299] 実施例２１９

4-ブロモ-N-[3-（ピロリジン-1-イル）ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

3-(ピロリジン-1-イル)安息香酸(33 mg, 0.14×1.2 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(0.6 mL)に溶解した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(33 mg, 0.14×1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(23 mg, 0.14×1.2 mmol)を加えて室温で30分攪拌した。そこへ4-ブロモデアセチルコルヒチン(62 mg,0.14 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムに溶解し、1 mol/L塩酸、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し

、標記の化合物(黄色固体, 10 mg, 11.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.93 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.27-7.12 (4H, m), 7.05 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.95 (1H, s), 6.69 (1H, dd, J = 8.2, 2.1 Hz), 4.49-4.42 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.24 (4H, t, J = 6.6 Hz), 3.17 (1H, dd, J = 13.7, 5.1 Hz), 2.29-2.21 (1H, m), 2.16-2.08 (1H, m), 2.07-1.98 (1H, m), 1.97-1.94 (4H, m).

ESI-MS m/z: 610 $[M+H]^+$, 612 $[M+2+H]^+$

[0300] 実施例２２０

4-ブロモ-N-(イソブチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへイソブチルイソチオシアネート(32 mg, 0.14×2 mmol)を加えて室温で6時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotagelsolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 33 mg, 42.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.01 (1H, br s), 7.58 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.77-4.66 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.25-3.10 (3H, m), 2.26-2.17 (1H, m), 2.12-2.01 (1H, m), 1.88-1.74 (2H, m), 0.84 (6H, d, J = 6.6 Hz).

ESI-MS m/z: 552 $[M+H]^+$, 554 $[M+2+H]^+$

[0301] 実施例２２１

4-ブロモ-N-(ベンジルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(64 mg, 0.15 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへベンジルイソチオシアネート(45 mg, 0.15×2 mmol)を加えて室温で6時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 77 mg, 87.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.21 (1H, br s), 7.97 (1H, br s), 7.33-7.22 (5H, m), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.04 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.77-4.71 (1H, m), 4.68-4.58 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J = 13.1, 5.0 Hz), 2.26-2.18 (1H, m), 2.13-2.02 (1H, m), 1.93-1.83 (1H, m).

ESI-MS m/z: 586 $[M+H]^+$, 588 $[M+2+H]^+$

[0302] 実施例２２２

4-ブロモ-N-[4-(N',N'-ジメチルアミノ)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(65 mg, 0.15 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへ4-N',N'-ジメチルアミノフェニルイソチオシアネート(53 mg, 0.15×2 mmol)を加えて室温で7時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 86 mg, 93.3%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.41 (1H, s), 8.03 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.15-7.13 (3H, m), 7.09 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.68 (2H, d, J = 9.0 Hz), 4.82-4.76 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J = 12.7, 4.9 Hz), 2.87 (6H, s), 2.24-2.16 (1H, m), 2.11-1.96 (2H, m).

ESI-MS m/z: 615 $[M+H]^+$, 617 $[M+2+H]^+$

[0303] 実施例２２３

4-ブロモ-N-(ピリジン-3-イルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(61 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへピリジン-3-イルイソチオシアネート(0.053 mL, 0.14×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロ

ロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 82 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.80 (1H, s), 8.67 (1H, d, J = 7.1 Hz), 8.56 (1H, d, J = 2.4 Hz), 8.28 (1H, dd, J = 4.8, 1.3 Hz), 7.94 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.32 (1H, dd, J = 8.2, 4.8 Hz), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.13 (1H, s), 7.05 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.79-4.73 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.15 (1H, dd, J = 12.6, 5.0 Hz), 2.28-2.10 (2H, m), 2.03-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 573 $[M+H]^+$, 575 $[M+2+H]^+$

[0304] 実施例２２４

4-ブロモ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(59 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.011 mL, 0.14×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.047 mL, 0.14×2.4 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。そこへジエチルアミン(0.020 mL, 0.14×2mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 39 mg, 50.5%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.54 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.08 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.99-4.93 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.70-3.64 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J = 13.2, 5.4 Hz), 2.30-2.16 (2H, m), 2.01-1.94 (1H, m), 1.09 (6H, t, J = 7.0 Hz).

ESI-MS m/z: 552 $[M+H]^+$, 554 $[M+2+H]^+$

[0305] 実施例２２５

4-ブロモ-N-(ピロリジン-1-イルチオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(58 mg, 0.13 mmol)をジクロロメタン(1.2

mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.011 mL, 0.13×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.043 mL, 0.13×2.4 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。そこへピロリジン(0.022 mL, 0.13×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 27 mg, 37.8%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.55 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.92-4.85 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.58-3.44 (4H, m), 3.12 (1H, dd, J = 12.4, 5.9 Hz), 2.24-2.15 (2H, m), 2.01-1.96 (1H, m), 1.93-1.83 (4H, m).

ESI-MS m/z: 550 $[M+H]^+$, 552 $[M+2+H]^+$

[0306] 実施例２２６

4-ブロモ-N-(ピペリジン-1-イルチオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(60 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.011 mL, 0.14×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.047 mL, 0.14×2.4 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。そこへピペリジン(0.029 mL, 0.14×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 49 mg, 62.1%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.85 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.94-4.87 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.84-3.76 (4H, m), 3.63 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J = 12.7, 5.9 Hz), 2.24-2.14 (2H, m), 2.03-1.93 (1H, m), 1.64-1.58 (2H, m), 1.51-1.44 (4H, m).

ESI-MS m/z: 564 $[M+H]^+$, 566 $[M+2+H]^+$

[0307] 実施例２２７

4-ブロモ-N-(4-ヒドロキシブチリル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-(4-ベンジルオキシブチロイル)デアセチルコルヒチン(86 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.7 mL)に溶解し-78℃で攪拌した。そこへ1 mol/L三臭化ホウ素ジクロロメタン溶液(0.14 mL, 0.14 mmol)を加えて-78℃で20分攪拌した。水、メタノールを加えてクロロホルム抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 13 mg, 17.8%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.58 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.13-7.11 (2H, m), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.45 (1H, t, J = 5.1 Hz), 4.24-4.18 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.36-3.31 (2H, m), 3.11 (1H, dd, J = 13.4, 5.4 Hz), 2.23-2.15 (3H, m), 1.98-1.88 (1H, m), 1.85-1.77 (1H, m), 1.62-1.54 (2H, m).

ESI-MS m/z: 523 $[M+H]^+$, 525 $[M+2+H]^+$

[0308] 実施例２２８

4-ブロモ-N-(チオモルホリン-4-イルチオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(60 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.011 mL, 0.14×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.047 mL, 0.14×2.4 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。そこへチオモルホリン(0.028 mL, 0.14×2mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 23 mg, 28.3%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.97 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.15 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.92-4.86 (1H, m), 4.21-4.09 (4H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.13 (1H

, dd, J = 12.1, 5.2 Hz), 2.60 (4H, t, J = 4.9 Hz), 2.25-2.14 (2H, m), 2.07-1.98 (1H, m).

ESI-MS m/z: 582 $[M+H]^+$, 584 $[M+2+H]^+$

[0309] 実施例２２９

4-ブロモ-N-(1,1-ジオキソチオモルホリン-4-イルチオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(59 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.011 mL, 0.14×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.047 mL, 0.14×2.4 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。そこへチオモルホリン-1,1-ジオキシド(38mg, 0.14×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 78 mg, 90.8%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ8.38 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.16 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.78 (1H, dd, J = 16.0, 8.4 Hz), 4.37-4.31 (2H, m), 4.23-4.18 (2H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.28-3.22 (2H, m), 3.16-3.08 (3H, m), 2.25-2.09 (3H, m).

ESI-MS m/z: 614 $[M+H]^+$, 616 $[M+2+H]^+$

[0310] 実施例２３０

4-ブロモ-N-(4-メチルピペラジン-1-イルチオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(60 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.011 mL, 0.14×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.047 mL, 0.14×2.4 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。そこへ4-メチルピペラジン(0.031 mL, 0.14×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標

記の化合物(黄色固体, 37 mg, 45.7%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.01 (1H, d, J = 6.3 Hz), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.01 (2H, m), 4.90-4.84 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.84-3.80 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.15-3.03 (4H, m), 2.39-2.30 (3H, m), 2.24-2.14 (5H, m), 2.04-1.94 (1H, m).

ESI-MS m/z: 579 $[M+H]^+$, 581 $[M+2+H]^+$

[0311] 実施例２３１

4-ブロモ-N-(モルホリン-4-イルチオカルボニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(60 mg, 0.14 mmol)をジクロロメタン(1.2 mL)に溶解し、氷冷した。そこへチオホスゲン(0.011 mL, 0.14×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.047 mL, 0.14×2.4 mmol)を加えて氷冷下2時間攪拌した。そこへモルホリン(0.024 mL, 0.14×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。クロロホルムを加えて0.1 mol/L塩酸で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 69 mg, 87.2%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.04 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.15 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.90-4.83 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.84-3.78 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.59 (4H, t, J = 4.8 Hz), 3.13 (1H, dd, J = 12.9, 5.9 Hz), 2.25-2.11 (2H, m), 2.06-1.97 (1H, m).

ESI-MS m/z: 566 $[M+H]^+$, 568 $[M+2+H]^+$

[0312] 実施例２３２

4-ブロモ-N-(エタンスルホニル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(240 mg, 0.55 mmol)をジクロロメタン(5.0 mL)に溶解し、氷冷した。そこへエタンスルホニルクロリド(0.78 mL, 0.55×1.5 mmol)、トリエチルアミン(0.153 mL, 0.55×2 mmol)を加えて室温で3

日間攪拌した。反応後、1 mol/L塩酸を加えてクロロホルム抽出した。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 267 mg, 91.9%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.09 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.45 (1H, s), 7.11 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.04 (1H, d, J = 10.5 Hz), 3.91 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89-3.88 (1H, m), 3.87 (3H, s), 3.48 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 12.9, 4.6 Hz), 2.90-2.77 (2H, m), 2.18-1.98 (2H, m), 1.86-1.78 (1H, m), 1.10 (3H, t, J = 7.3 Hz).

ESI-MS m/z: 529 $[M+H]^+$, 531 $[M+2+H]^+$.

[0313] 実施例２３３

4-クロロ-2,3-ジデメチルコルヒチンの合成

4-クロロコルヒチン(1.148 g, 2.65 mmol)を濃硫酸(3.8 mL)に溶解し、55℃で3時間攪拌し、さらに87℃で2時間攪拌した。反応液を氷水に注ぎ、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液(100 mL)を加えた。クロロホルム:メタノール=5:1で抽出した。飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 162 mg, 15.1%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.49 (1H, s), 9.28 (1H, s), 8.60 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.13-7.10 (2H, m), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.30-4.24 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.40 (3H, s), 3.03 (1H, dd, J = 13.3, 5.0 Hz), 2.07-1.98 (1H, m), 1.96-1.88 (1H, m), 1.85 (3H, s), 1.81-1.74 (1H, m).

ESI-MS m/z: 406 $[M+H]^+$.

[0314] 実施例２３４

4-クロロ-2,3-(メチレンジオキシ)-2,3-ジデメトキシコルヒチンの合成

4-クロロ-2,3-ジデメチルコルヒチン(51 mg, 0.126 mmol)をアセトニトリ

ル(1.5 mL)に溶解した。そこへ炭酸カリウム(35 mg, 0.126×2 mmol)、ブロモクロロメタン(0.016 mL,0.126×2 mmol)を加えて7時間加熱還流した。さらに炭酸カリウム(35 mg, 0.126×2 mmol)、ブロモクロロメタン(0.016 mL, 0.126×2 mmol)、N,N-ジメチルホルムアミド(1.5 mL)を加えて90℃で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。水を加えてクロロホルム:メタノール=5:1で抽出した。飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g,クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 36 mg, 68.4%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.57 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.12 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.01 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.20 (1H, d, J = 1.0 Hz), 6.19 (1H, d, J = 1.0 Hz), 4.30-4.24 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.74 (3H, s), 2.99 (1H, dd, J = 13.2, 4.9 Hz), 2.09-2.01 (1H, m), 1.97-1.89 (1H, m), 1.86 (3H, s), 1.82-1.75 (1H, m).

ESI-MS m/z: 418 $[M+H]^+$.

[0315] 実施例２３５

4-クロロ-2,3-(エチレンジオキシ)-2,3-ジデメトキシコルヒチンの合成

4-クロロ-2,3-ジデメチルコルヒチン(51 mg, 0.126 mmol)をアセトニトリル(1.5 mL)、N,N-ジメチルホルムアミド(1.5 mL)に溶解した。そこへ1,2-ジブロモエタン(0.012 mL, 0.126×1.1 mmol)、炭酸カリウム(44 mg, 0.126×2.5 mmol)、ヨウ化ナトリウム(1 mg, 0.126×0.05 mmol)を加えて90℃で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。水を加えてクロロホルム:メタノール=5:1で抽出した。飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 9 mg, 16.5%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.60 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.11 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.01 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.47-4.34 (

4H, m), 4.28-4.22 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.51 (3H, s), 3.06 (1H, dd, J = 13.7, 5.6 Hz), 2.10-2.01 (1H, m), 1.96-1.88 (1H, m), 1.85 (3H, s), 1.83-1.75 (1H, m).

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

[0316] 実施例２３６

1,2-ジデメチルコルヒチンの合成

コルヒチン(1.214 g, 3.04 mmol)を濃硫酸(4.2 mL)に溶解し、55℃で3時間攪拌し、さらに87℃で2時間攪拌した。反応液を氷水に注ぎ、1 mol/L水酸化ナトリウム水溶液(100 mL)を加えた。クロロホルム:メタノール=5:1で抽出した。飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 44 mg, 4.1%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.64 (1H, s), 8.55 (1H, s), 8.44 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.21 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.14 (1H, s), 7.00 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.42 (1H, s), 4.42-4.35 (1H, m), 3.86 (3H, s), 3.81 (3H, s), 2.48-2.43 (1H, m), 2.22-2.14 (1H, m), 2.04-1.95 (1H, m), 1.85 (3H, s), 1.80-1.72 (1H, m).

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

[0317] 実施例２３７

1,2-(メチレンジオキシ)-1,2-ジデメトキシコルヒチンの合成

1,2-デジメトキシコルヒチン(37 mg, 0.10 mmol)をN,N-ジメチルホルムアミド(1.1 mL)に溶解した。そこへ炭酸カリウム(28 mg, 0.10×2 mmol)、ブロモクロロメタン(0.013 mL, 0.10×2 mmol)を加えて90℃で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。水を加えてクロロホルム:メタノール=5:1で抽出した。飽和食塩水で洗った。無水硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage IsoleraOne, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 38 mg,99.

OnCusp
Ex. 1038

1%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.52 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.29 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.13 (1H, s), 7.00 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.62 (1H, s), 6.07 (2H, dd, J = 19.4, 0.9 Hz), 4.43-4.36 (1H, m), 3.86 (6H, s), 3.32 (3H, s), 2.60 (1H, dd, J = 13.3, 6.2 Hz), 2.30-2.22 (1H, m), 2.12-2.01 (1H, m), 1.90-1.87 (1H, m), 1.85 (3H, s).

ESI-MS m/z: 384 $[M+H]^+$.

[0318] 実施例２３８

4-クロロ-1,2-(メチレンジオキシ)-1,2-ジデメトキシコルヒチンの合成

1,2-(メチレンジオキシ)-1,2-ジデメトキシコルヒチン(23 mg, 0.0599 mmol)をアセトニトリル(0.5 mL)に溶解した。そこへN-クロロスクシンイミド(10 mg, 0.749 mmol)を加えて室温で2日間攪拌した。Waters社製MSトリガー付き分取LCシステムを用い、標記の化合物(黄色固体, 11 mg, 43.9%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.57 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.31 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.12 (1H, s), 7.01 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.16 (1H, d, J = 0.7 Hz), 6.13 (1H, d, J = 0.7 Hz), 4.35-4.28 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.08 (1H, dd, J = 13.3, 5.2 Hz), 2.18-2.10 (1H, m), 2.04-1.95 (1H, m), 1.89-1.81 (4H, m).

ESI-MS m/z: 418 $[M+H]^+$.

MSトリガー付き分取システム

装置 ; Mass Detector 3100

Binary Gradient Module 2545

Sample Manager 2767

System Fludics Organizer

Photodiode Array Detector 2998

Mass Lynx

カラム ; waters Sun Fire Prep C18 OBD(5μm 30×150 mm)

条件 ; 水:アセトニトリル=9:1を2分間、その後20分間かけて水:アセトニトリ

ル=9:1から水:アセトニトリル=1:9にグラジエントした。

流量；20 mL/分

[0319] 実施例２３９

4-クロロ-N-(エチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をメタノール-水（2:1, 1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸エチル（22 μl, 0.128 × 2 mmol）を加え、0℃で75分撹拌した。反応液をクロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 30 mg, 0.063 mmol, 49%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.44 (1H, br.s), 7.84 (1H, s), 7.50 (1H, dd, J = 10.7 Hz), 7.04 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.07-5.01 (1H, m), 4.07 (3H, s), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.74 (3H, s), 3.63-3.56 (1H, m), 3.38-3.33 (1H, m), 3.25 (1H, dd, J = 13.7, 5.4 Hz), 2.49-2.40 (1H, m), 2.13-2.10 (1H, m), 1.96-1.89 (1H, m), 1.11 (3H, t, J = 7.2 Hz).
ESI-MS m/z: 479 ($[M+H]^+$)

[0320] 実施例２４０

4-クロロ-N-(フェニルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-クロロデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.128 mmol）をメタノール-水（2:1, 1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸フェニル（30μl, 0.128 × 2 mmol）を加え、0℃で75分撹拌した。反応液をクロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 50 mg, 0.095 mmol, 74%）を得た。

OnCusp
Ex. 1038

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.85 (1H, br.s), 8.01 (1H, br.s), 7.86 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.50 (1H, d, J = 10.2 Hz), 7.36 (1H, d, J = 7.6 Hz), 7.29-7.27 (2H, m), 7.15 (1H, t, J = 7.2Hz), 7.02 (1H, d, J = 11.2 Hz), 5.13-5.07 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.20 (1H, dd, J = 13.8, 5.7 Hz), 2.45-2.35 (1H, m), 2.04-1.98 (1H, m), 1.94-1.86 (1H, m).

ESI-MS m/z: 527 ([M+H]$^+$)

[0321] 実施例２４１

4-クロロ-N-(4-ピペリジノピペリジン-1-カルボキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(ヒドロキシアセチル)デアセチルコルヒチン(0.107 g, 0.238 mmol)のジクロロメタン(有機合成用, 5 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて4-ジメチルアミノピリジン(12 mg, 0.238×0.4 mmol)、トリエチルアミン(82.9 μL, 0.238×2.5 mmol)及び、4-ピペリジノピペリジン-1-カルボニルクロリド(0.121 g, 0.238×2.2 mmol)を添加した。本溶液を徐々に室温に戻しながら一晩撹拌した後、クロロホルムと飽和重曹水を加えた。有機層を取り、水層は再びクロロホルムで抽出した。有機層は合わせてブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(乳白色固体, 0.112 g, 0.174 mmol, 73%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.74 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.13 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.48 (2H, s), 4.27-4.21 (1H, m), 4.07-3.94 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J=14.0, 4.5 Hz), 2.83-2.68 (2H, m), 2.56-2.33 (5H, m), 2.16-2.07 (1H, m), 2.00-1.83 (2H, m), 1.75-1.24 (10H, m).

ESI-MS m/z: 644 [M+H]$^+$.

[0322] 実施例２４２

4-クロロ-N-(4-ピペリジノピペリジン-1-カルボキシアセチル)デアセチルコルヒチン塩酸塩の合成

4-クロロ-N-(4-ピペリジノピペリジン-1-カルボキシアセチル)デアセチルコルヒチン(69 mg, 0.107 mmol)のアセトン(2 mL)溶液に、室温にて10%HCl-メタノール(65μL, 0.107×1.5 mmol)を添加した。本溶液を減圧下、濃縮乾固して標記化合物(乳白色固体, 72 mg,0.106 mmol, 99%, HPLC純度97.8%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.89 (1H, s), 8.78 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.12 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.50 (2H, s), 4.28-4.21 (1H, m), 4.12-3.99 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.29-2.68 (6H, m), 3.12 (1H, dd, J=13.4, 5.4 Hz), 2.16-2.07 (1H, m), 2.01-1.34 (12H, m).

[0323] 実施例２４３

4-クロロ-N-(1-メチルピペラジン-4-カルボキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(4-ピペリジノピペリジン-1-カルボキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(乳白色固体, 25 mg, 0.043 mmol, 61%)を得た。4-ピペリジノピペリジン-1-カルボニルクロリドの代わりに1-メチルピペラジン-4-カルボニルクロリド塩酸塩(8.8 eq.)、さらにはトリエチルアミン(19 eq.)を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.33 (1H, s), 7.25 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.09 (1H, s), 6.81 (1H, d, J=10.7Hz), 4.65 (1H, d, J=14.9 Hz), 4.61-4.54 (1H, m), 4.54 (1H, d, J=14.9 Hz), 4.00 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.68-3.59 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.26 (1H, dd, J=13.1, 4.5 Hz), 2.62-2.40 (4H, m), 2.42 (3H, s), 2.28-2.14 (2H, m), 1.85-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 576 $[M+H]^+$.

OnCusp
Ex. 1038

[0324] 実施例２４４

4-クロロ-N-(ジメチルアミノアセトキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(4-ピペリジノピペリジン-1-カルボキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(乳白色固体, 35 mg)を得た。4-ピペリジノピペリジン-1-カルボニルクロリドの代わりにN,N-ジメチルグリシンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.86 (1H, d, J=6.3 Hz), 7.42 (1H, s), 7.27 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.82 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.67 (1H, d, J=15.4 Hz), 4.65-4.57 (1H, m), 4.60 (1H, d, J=15.4 Hz), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.41-3.24 (3H, m), 2.43 (3H, s), 2.42 (3H, s), 2.28-2.14 (2H, m), 1.97-1.90 (1H, m).

ESI-MS m/z : 535 $[M+H]^+$.

[0325] 実施例２４５

4-クロロ-N-[3-(ジメチルアミノ)プロピオニルオキシアセチル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(4-ピペリジノピペリジン-1-カルボキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(乳白色固体, 33 mg)を得た。4-ピペリジノピペリジン-1-カルボニルクロリドの代わりにN,N-ジメチルホモグリシンを用いた。

ESI-MS m/z : 549 $[M+H]^+$.

[0326] 実施例２４６

4-クロロ-N-[1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-カルボキシアセチル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(ヒドロキシアセチル)デアセチルコルヒチン(50 mg, 0.111 mmol)のジクロロメタン(有機合成用, 2.2 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にて1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-カルボン酸(58 mg, 0.111×2 mmol)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸

塩(47 mg, 0.4111×2.2 mmol)、及び4-(ジメチルアミノ)ピリジン(5 mg, 0.111×0.4 mmol)を添加して一晩撹拌した。反応液をクロロホルム及びブラインで希釈して、有機層を取った。有機層は飽和重曹水、次いでブラインで洗浄後、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残留物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記化合物(乳白色固体, 72 mg, 0.104 mmol, 94%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.41 (1H, s), 7.39-7.31 (5H, m), 7.30 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.01 (1H, s), 6.85 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.13 (2H, s), 4.65-4.55 (1H, m), 4.63 (1H, d, J=15.6 Hz), 4.56 (1H, d, J=15.6 Hz), 4.21-4.09 (2H, m), 4.02 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.28 (1H, dd, J=13.1, 4.5 Hz), 2.97-2.86 (2H, m), 2.65-2.56 (1H, m), 2.32-2.14 (2H, m), 2.00-1.64 (5H, m).

ESI-MS m/z: 695 $[M+H]^+$.

[0327] 実施例２４７

4-クロロ-N-(チオアセトキシアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(クロロアセチル)デアセチルコルヒチン(50 mg, 0.12 mmol)をアセトン(12mL)に溶解し、チオ酢酸カリウム(82 mg, 0.72 mmol, 6 eq)を加え65 ℃で3時間撹拌した。反応液を減圧留去し、残渣をクロロホルムに溶解し、水で洗浄した。有機層をブライン洗浄、無水硫酸マグネシウムにて乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (5%メタノール/酢酸エチル→ 10%メタノール/酢酸エチル)にて精製し、目的物の4-クロロ-N-(チオアセトキシアセチル)デアセチルコルヒチン(55.8 mg, 98 %)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.29 (1H, br-d), 7.28 (1H, s), 7.24 (1H, d, J=10.6 Hz), 6.80 (1H, d, J=10.8 Hz), 4.49 (1H, ddd, J=12.2, 6.1, 6.1 Hz), 4.00 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (1H, dd, J=14.5, 1.8 Hz), 3.60 (3H, s), 3.54 (1H, dd, J=14.4, 2.5 Hz), 3.25 (1H, m

), 2.45 (3H, s), 2.25-2.12 (2H, overlapped), 1.78 (1H, ddd, J=11.0, 11.0, 4.9 Hz).

FAB-MS (NBA) m/z: 508 $[M+H]^+$

[0328] 実施例２４８

4-クロロ-N-(メルカプトアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(チオアセトキシアセチル)デアセチルコルヒチン(10 mg, 0.020 mmolをメタノール(4.5 mL)に溶解し、1M ナトリウムメトキシド(30 μL, 0.030 mmol, 1.5 eq)を加え室温で40分間撹拌した。反応液に酢酸(3滴)を加え、弱酸性とした後、溶媒を減圧留去した。残渣をクロロホルムに溶解し、水で洗浄、有機層をブライン洗浄、無水硫酸マグネシウム乾燥、ろ過、減圧留去、真空乾燥した。得られた残渣をシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィー (2%メタノール/クロロホルム→5%メタノール/クロロホルム)にて精製し、目的物の4-クロロ-N-(チオアセチル)デアセチルコルヒチン(9.5 mg, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.67 (1H, br-d, J=7.0 Hz), 7.40 (1H, s), 7.28 (1H, d, J=10.4 Hz), 6.83 (1H, d, J=10.8 Hz), 4.53 (1H, ddd, J=12.1, 6.2, 6.2 Hz), 4.01 (3H, s), 3.99 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.26 (3H, m), 2.33 (2H, m), 1.84 (1H, ddd, J=11.5, 11.5, 4.9 Hz).

FAB-MS (NBA) m/z: 466 $[M+H]^+$

[0329] 実施例２４９

4-クロロ-N-[1-(エトキシカルボニル)ピペリジン-4-イルカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

1-(エトキシカルボニル)ピペリジン-4-カルボン酸(17 mg, 0.0766×1.1 mmol)のジクロロメタン(2 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(16 mg, 0.0766×1.1 mmol)及び1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(13 mg, 0.0766×1.1 mmol)を添加して、30分間撹拌した。次いで、4-クロロデアセチルコルヒチ

ン(30 mg, 0.0766 mmol)を添加して、徐々に室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 41 mg, 0.0714 mmol, 93%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.59 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.12 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.09 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.24-4.17 (1H, m), 4.01-3.87 (2H, m), 4.01 (2H, q, J=7.1 Hz), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J=13.2, 5.4 Hz), 2.86-2.72 (2H, m), 2.45-2.37 (1H, m), 2.15-2.06 (1H, m), 2.00-1.81 (2H, m), 1.66 (2H, dd, J=28.8, 11.2 Hz), 1.40-1.27 (2H, m), 1.16 (3H, t, J=7.1 Hz).

ESI-MS m/z: 575 $[M+H]^+$.

[0330] 参考例２３

4-([1,3]ジチオラン-2-イル)コルヒチンの合成

4-ホルミルコルヒチン(50 mg, 0.117 mmol)のクロロホルム(1 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にて1,2-エタンジチオール(14.6μL, 0.117×1.5 mmol)及びヨウ素(3 mg, 0.117×0.1 mmol)を加えて、一晩撹拌した。反応液に10%亜硫酸ナトリウムを加えて、10分間撹拌した後、クロロホルムを加えて有機層を取った。有機層はブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 32 mg, 0.0634 mmol, 54%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.56 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.08 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.00 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.38 (1H, s), 4.28-4.21 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.71 (1H, dd, J=13.5, 5.5 Hz), 3.58-3.51 (2H, m), 3.50 (3H, s), 3.42-3.35 (2H, m), 2.25-2.17 (1H, m), 2.03-1.95 (1H, m), 1.86 (3H, s), 1.80-1.72 (1H, m).

ESI-MS m/z: 504 $[M+H]^+$.

[0331] 参考例２４

4-([1,3]ジチアン-2-イル)コルヒチンの合成

4-([1,3]ジチオラン-2-イル)コルヒチンの合成と同様の方法にて、標記化合物(淡褐色固体, 0.224 g, 0.432 mmol, 74%)を得た。1,2-エタンジチオールの代わりに、1,3-プロパンジチオールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.58 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.08 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.99 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.26-4.20 (1H, m), 3.94-3.89 (1H, m), 3.88 (3H, m), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.18-3.09 (2H, m), 2.94-2.85 (2H, m), 2.19-2.01 (3H, m), 1.88-1.80 (1H, m), 1.86 (3H, s), 1.73-1.63 (1H, m).

ESI-MS m/z: 518 $[M+H]^+$.

[0332] 参考例２５

4-(ヒドロキシメチル)コルヒチンの合成

4-ホルミルコルヒチン(100 mg, 0.234 mmol)のメタノール(2.5 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にて水素化ホウ素ナトリウム(13 mg, 0.234×1.5 mmol)を添加して、室温で3時間撹拌した。反応液にアセトンを加えて30分間撹拌した後、クロロホルムと水を加えた。有機層を取り、水層はさらにクロロホルムにて抽出した。有機層は合わせてブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 74 mg, 0.173 mmol, 74%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.55 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.11 (1H, s), 7.09 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.87 (1H, t, J=5.1 Hz), 4.54 (1H, dd, J=11.3, 4.4 Hz), 4.47 (1H, dd, J=11.3, 5.9 Hz), 4.31-4.24 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.00 (1H, dd, J=12.6, 4.5 Hz), 2.10-1.95 (2H, m), 1.85 (3H, s), 1.81-1.73 (1H, m).

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

[0333] 実施例２５０

4-(フルオロメチル)コルヒチンの合成

4-(ヒドロキシメチル)コルヒチン(30 mg, 0.0699 mmol)のジクロロメタン(1 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて(ジエチルアミノ)サルファートリフルオリド(11.0μL , 0.0699×1.2 mmol)を添加して、氷冷下2時間撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 19 mg, 0.0442 mmol, 63%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.60 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.11 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.49 (2H, d, J=48.5 Hz), 4.28-4.21 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.54 (3H, s), 2.93 (1H, dd, J=13.9, 4.6 Hz), 2.13-1.94 (2H, m), 1.86-1.77 (1H, m), 1.85 (3H, s).

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

[0334] 実施例２５１

4-(ジフルオロメチル)コルヒチンの合成

N-ヨードコハク酸イミド(87 mg, 0.0966×4 mmol)のジクロロメタン(5 mL)溶液に、-78℃付近、アルゴンガス雰囲気下にて、フッ化水素・ピリジン(HF: 65%, 119 mg, 0.0966×40 mmol)のジクロロメタン(1 mL)溶液を添加した。-78℃付近で20分間撹拌した後、4-([1,3]ジチアン-2-イル)コルヒチン(50 mg, 0.0966 mmol)のジクロロメタン(1 mL)溶液を添加して、徐々に室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液に10%亜硫酸ナトリウムを加えて10分間撹拌した後、クロロホルムと飽和重曹水を加えた。有機層を取り、飽和重曹水、0.1mol/L塩酸、飽和重曹水次いでブラインで洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物[41 mg, HPLC純度:60%(4-CHO体:23%)]をメタノール(2 mL)に溶解し、室温、アルゴンガス雰囲気下にて、水素化ホウ素ナトリウム(2 mg, 0.0966×0.5 mmol)を添加して、30分間撹拌した後、アセ

トンを加えて、さらに30分間撹拌した。反応液にクロロホルムと水を加えて有機層を取った。有機層はブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(白色固体, 30 mg, 0.0674 mmol, 70%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.62 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.25 (1H, t, J=54.0 Hz), 7.11 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.10 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.28-4.21 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.56 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J=13.7, 4.9 Hz), 2.17-2.08 (1H, m), 1.99-1.91 (1H, m), 1.87-1.80 (1H, m), 1.86 (3H, s).

ESI-MS m/z: 450 $[M+H]^+$.

[0335] 実施例２５２

4-クロロ-N-(N',N'-ジメチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 37 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。ジエチルアミンの代わりに、ジメチルアミン塩酸塩及びトリエチルアミンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.63 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.15 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.09 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.91-4.85 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.20 (6H, s), 3.12 (1H, dd, J=13.2, 5.1 Hz), 2.26-2.18 (1H, m), 2.16-2.08 (1H, m), 2.04-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 479 $[M+H]^+$.

[0336] 実施例２５３

4-クロロ-N-(N',N'-ジプロピルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの

OnCusp
Ex. 1038

合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 41 mg, 0.0747 mmol, 98 %)を得た。ジエチルアミンの代わりに、ジ-n-プロピルアミンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.50 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.09 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.01-4.94 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.69-3.61 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.54-3.46 (2H, m), 3.13 (1H, dd, J=13.3, 5.2 Hz), 2.31-2.23 (1H, m), 2.16-2.07 (1H, m), 2.01-1.93 (1H, m), 1.60-1.50 (4H, m), 0.83 (6H, t, J=7.3 Hz).

ESI-MS m/z: 535 $[M+H]^+$.

[0337] 実施例２５４

4-クロロ-N-[N'-エチル-N'-プロピルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 40 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。ジエチルアミンの代わりに、N-エチル-n-プロピルアミンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.51 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.09 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 5.01-4.95 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.74-3.52 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=14.1, 5.1 Hz), 2.33-2.23 (1H, m), 2.15-2.07 (1H, m), 2.02-1.92 (1H, m), 1.60-1.51 (2H, m), 1.09 (3H, t, J=7.0 Hz), 0.83 (3H, t, J=7.3 Hz).

ESI-MS m/z: 521 $[M+H]^+$.

[0338] 実施例２５５

4-クロロ-N-[(4-ヒドロキシピペリジン-1-イル)チオカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 41 mg, 0.0766 mmol, 定

OnCusp
Ex. 1038

量的)を得た。ジエチルアミンの代わりに、4-ヒドロキシピペリジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.90 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.15 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.06 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.95-4.88 (1H, m), 4.74 (1H, d, J=4.1 Hz), 4.28-4.17 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.76-3.70 (1H, m), 3.62 (3H, s), 3.49-3.38 (2H, m), 3.12 (1H, dd, J=12.9, 5.4 Hz), 2.22-1.96 (3H, m), 1.75-1.68 (2H, m), 1.35-1.26 (2H, m).

ESI-MS m/z: 535 $[M+H]^+$.

[0339] 実施例２５６

4-クロロ-N-[(4-メチルピペリジン-1-イル)チオカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 41 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。ジエチルアミンの代わりに、4-メチルピペリジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.86 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (2H, s), 7.02 (2H, d, J=11.7 Hz), 4.95-4.89 (1H, m), 4.65 (2H, dd, J=28.4, 14.0 Hz), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=12.9, 5.1 Hz), 2.98 (2H, q, J=12.8 Hz), 2.23-1.94 (3H, m), 1.62 (3H, t, J=10.5 Hz), 1.09-0.93 (2H, m), 0.89 (3H, d, J=6.1 Hz).

ESI-MS m/z: 533 $[M+H]^+$.

[0340] 実施例２５７

4-クロロ-N-{N'-[2-(ジメチルアミノ)エチル]-N'-メチルチオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 38 mg, 0.0710 mmol, 93%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、N,N,N'-トリメチルエチレンジアミ

ンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86-3.66 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.17 (3H, s), 3.16-3.10 (1H, m), 2.27 (6H, s), 2.17-2.02 (3H, m).

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

[0341] 実施例２５８

4-クロロ-N-{[4-(ジメチルアミノ)ピペリジン-1-イル]チオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 28 mg, 0.0499 mmol, 65%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、4-(ジメチルアミノ)ピペリジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.92 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.93-4.87 (1H, m), 4.66 (2H, dd, J=25.5, 13.5 Hz), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=12.7, 5.6 Hz), 3.01 (2H, q, J=11.8 Hz), 2.44-2.36 (1H, m), 2.22-1.97 (3H, m), 2.17 (6H, s), 1.74 (2H, t, J=11.8 Hz), 1.33-1.26 (2H, m).

ESI-MS m/z: 562 $[M+H]^+$.

[0342] 実施例２５９

4-クロロ-N-(N'-エチル-N'-メチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 37 mg, 0.0746 mmol, 97%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、N-エチルメチルアミンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.58 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.08 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.94-4.88 (1H, m),

OnCusp
Ex. 1038

3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.84-3.77 (1H, m), 3.69-3.62 (1H, m), 3.62 (3H, s), 3.15 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=13.3, 5.0 Hz), 2.28-2.20 (1H, m), 2.16-2.08 (1H, m), 2.04-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 493 $[M+H]^+$.

[0343] 実施例２６０

4-クロロ-N-[1-アセチルピペラジン-4-イル)チオカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 32 mg, 0.0570 mmol, 74%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、1-アセチルピペラジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.07 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=11.7 Hz), 4.92-4.85 (1H, m), 3.96-3.75 (4H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.51-3.46 (4H, m), 3.13 (1H, dd, J=11.8, 4.0 Hz), 2.22-1.99 (3H, m), 2.02 (3H, s).

ESI-MS m/z: 562 $[M+H]^+$.

[0344] 実施例２６１

4-クロロ-N-[N'-(2-ヒドロキシエチル)-N'-メチルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 36 mg, 0.0707 mmol, 92%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、2-(メチルアミノ)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.75 (1H, d, J=6.3 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.08 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.98 (1H, br-s), 4.89-4.83 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86-3.64 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.59-3.54 (2H, m), 3.21 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=12.6, 5.2 Hz), 2.21-1.97 (3H, m).

ESI-MS m/z: 509 $[M+H]^+$.

[0345] 実施例２６２

4-クロロ-N-[N'-(3-ヒドロキシプロピル)-N'-メチルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 36 mg, 0.0689 mmol, 90 %)を得た。ジエチルアミンの代わりに、3-(メチルアミノ)-1-プロパノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.68 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.07 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.89-4.83 (1H, m), 4.65 (1H, br-s), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.77-3.66 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.41-3.36 (2H, m), 3.15 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J=14.6, 7.3 Hz), 2.22-1.99 (3H, m), 1.71-1.63 (2H, m).

ESI-MS m/z: 523 $[M+H]^+$.

[0346] 実施例２６３

4-クロロ-N-[N',N'-ビス(2-ヒドロキシエチル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 39 mg, 0.0729 mmol, 95 %)を得た。ジエチルアミンの代わりに、ジエタノールアミンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.13 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.08 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.80-3.69 (4H, m), 3.65-3.58 (4H, m), 3.62 (3H, s), 3.15-3.09 (1H, m), 2.17-2.00 (3H, m).

ESI-MS m/z: 523 $[M+H]^+$.

[0347] 実施例２６４

4-クロロ-N-[(3-ヒドロキシプロピル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 15 mg, 0.0295 mmol, 38%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、3-アミノ-1-プロパノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.07 (1H, br-s), 7.52 (1H, br-s), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.79-4.71 (1H, m), 4.53 (1H, br-s), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.45-3.35 (4H, m), 3.14-3.09 (1H, m), 2.16-1.82 (3H, m), 1.64-1.57 (2H, m).

ESI-MS m/z: 509 $[M+H]^+$.

[0348] 実施例２６５

4-クロロ-N-[(4,4-ジフルオロピペリジン-1-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 42 mg, 0.0748 mmol, 98%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、4,4-ジフルオロピペリジン塩酸塩及びトリエチルアミンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.24 (1H, d, J=6.8 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.5 Hz), 7.05 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.87-4.81 (1H, m), 4.04-3.97 (2H, m), 3.95-3.87 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J=11.3, 4.3 Hz), 2.20-1.91 (7H, m).

ESI-MS m/z: 555 $[M+H]^+$.

[0349] 実施例２６６

N-[(アゼチジン-1-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 7 mg, 0.0138 mmol, 18%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、アゼチジンを用いた。精製は高速液体

クロマトグラフ法にて行った。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.85 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.14 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.08 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.80-4.73 (1H, m), 4.08-3.90 (4H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=12.6, 6.2 Hz), 2.22-2.06 (4H, m), 2.02-1.92 (1H, m).

ESI-MS m/z: 491 $[M+H]^+$.

[0350] 実施例２６７

4-クロロ-N-[(インダゾール-5-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(微褐色固体, 44 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。ジエチルアミンの代わりに、5-アミノインダゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 13.04 (1H, s), 9.66 (1H, s), 8.26 (1H, d, J=7.1 Hz), 8.02 (1H, s), 7.75 (1H, s), 7.48 (1H, d, J=8.8 Hz), 7.26 (1H, d, J=9.0 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.13 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.87-4.80 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.17-3.08 (1H, m), 2.17-1.99 (3H, m).

ESI-MS m/z: 567 $[M+H]^+$.

[0351] 実施例２６８

4-クロロ-N-[(cis-2,6-ジメチルモルホリン-4-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 42 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。ジエチルアミンの代わりに、cis-2,6-ジメチルモルホリンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.00 (1H, d, J=6.8 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.04 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.93-4.86 (1H, m),

4.61 (2H, dd, J=29.6, 13.1 Hz), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.52-3.43 (2H, m), 3.15-3.10 (1H, m), 2.65-2.57 (2H, m), 2.20-2.00 (3H, m), 1.10 (6H, t, J=6.7 Hz).

ESI-MS m/z: 549 $[M+H]^+$.

[0352] 実施例２６９

4-クロロ-N-(2-トリルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 7 mg, 0.0130 mmol, 17%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、o-トルイジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.20 (1H, s), 8.23 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.24-7.12 (6H, m), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.86-4.79 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.59 (3H, s), 3.15-3.10 (1H, m), 2.17 (3H, s), 2.16-1.98 (3H, m).

ESI-MS m/z: 541 $[M+H]^+$.

[0353] 実施例２７０

4-クロロ-N-(3-トリルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 13 mg, 0.0245 mmol, 32%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、m-トルイジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.62 (1H, s), 8.38 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.28-7.12 (5H, m), 7.04 (1H, d, J=11.0 Hz), 6.91 (1H, d, J=7.1 Hz), 4.84-4.77 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.17-3.11 (1H, m), 2.26 (3H, s), 2.20-1.98 (3H, m).

ESI-MS m/z: 541 $[M+H]^+$.

[0354] 実施例２７１

4-クロロ-N-[3-(ジメチルアミノ)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの

合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 16 mg, 0.0276 mmol, 36 %)を得た。ジエチルアミンの代わりに、N,N-ジメチル-m-フェニレンジアミン塩酸塩及びトリエチルアミンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.60 (1H, s), 8.29 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.9 Hz), 7.11 (1H, s), 7.10 (1H, t, J=8.1 Hz), 7.03 (1H, d, J=10.9 Hz), 6.91 (1H, t, J=2.0 Hz), 6.66 (1H, dd, J=8.1, 1.6 Hz), 6.48 (1H, dd, J=8.1, 2.4 Hz), 4.84-4.78 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.17-3.08 (1H, m), 2.86 (6H, s), 2.18-1.99 (3H, m).

ESI-MS m/z: 570 $[M+H]^+$.

[0355] 実施例２７２

4-クロロ-N-[4-(2-ヒドロキシエチル)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 37 mg, 0.0644 mmol, 84 %)を得た。ジエチルアミンの代わりに、2-(4-アミノフェニル)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.62 (1H, s), 8.35 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.32 (2H, d, J=8.5 Hz), 7.17-7.12 (4H, m), 7.04 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.82-4.76 (1H, m), 4.62 (1H, t, J=5.3 Hz), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.57 (2H, td, J=7.1, 5.3 Hz), 3.17-3.09 (1H, m), 2.67 (2H, t, J=7.1 Hz), 2.19-1.97 (3H, m).

ESI-MS m/z: 571 $[M+H]^+$.

[0356] 参考例２６

2-(3-アミノフェニル)エタノールの合成

2-(3-ニトロフェニル)エタノール(200 mg, 1.20 mmol)のテトラヒドロフラン(2 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて10%パラジウム-炭素(M)Dry(20 mg)を添加した。反応容器内を減圧下脱気した後、水素ガスで置換した

。反応液は室温、水素ガス雰囲気下(風船)にて90分間激しく撹拌した。不溶物をろ去、THFで洗いこんだ後、ろ液と洗浄液は合わせて濃縮乾固し、標記の化合物(乳白色固体, 165 mg, 1.20 mmol, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 6.89 (1H, t, J=7.7 Hz), 6.40-6.32 (3H, m), 4.92 (2H, s), 4.58 (1H, t, J=5.4 Hz), 3.53 (2H, td, J=7.4, 5.4 Hz), 2.55 (2H, t, J=7.4 Hz).

[0357] 実施例２７３

4-クロロ-N-[3-(2-ヒドロキシエチル)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-(N',N'-ジエチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 40 mg, 0.0696 mmol, 91%)を得た。ジエチルアミンの代わりに、2-(3-アミノフェニル)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.67 (1H, s), 8.37 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.30-7.25 (2H, m), 7.20 (1H, t, J=7.6 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.95 (1H, d, J=7.6 Hz), 4.83-4.75 (1H, m), 4.60 (1H,t, J=5.1 Hz), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.58 (2H, td, J=7.1, 5.1 Hz), 3.18-3.09 (1H, m), 2.68 (2H, t, J=7.1 Hz), 2.19-1.97 (3H, m).

[0358] 実施例２７４

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-シアノアニリン(14 mg, 0.0766×1.5 mmol)のジクロロメタン(1.5 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて、チオホスゲン(8.75 μL, 0.0766×1.5 mmol)およびトリエチルアミン(32.0 μL, 0.0766×3 mmol)を添加して、同温度で2時間撹拌した。4-クロロデアセチルコルヒチン(30 mg, 0.076 mmol)を添加した後、室温に徐々に戻しながら一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)

OnCusp
Ex. 1038

にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 42 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.12 (1H, s), 8.83 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.76-7.71 (4H, m), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.12 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.77-4.71 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.11 (1H, m), 2.22-1.98 (3H, m).

ESI-MS m/z: 552 $[M+H]^+$.

[0359] 実施例２７５

4-クロロ-N-[2,1,3-ベンゾチアジアゾール-4-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(黄色固体, 31 mg, 0.0528 mmol, 69%)を得た。4-シアノアニリンの代わりに、4-アミノ-2,1,3-ベンゾチアジアゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.20 (1H, d, J=7.1 Hz), 8.56 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.78 (1H, d, J=8.8 Hz), 7.65 (1H, dd, J=8.8, 7.6 Hz), 7.19 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.13 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.86-4.79 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.16 (1H, dd, J=21.0, 13.4 Hz), 2.22-2.13 (2H, m), 1.98-1.92 (1H, m).

ESI-MS m/z: 585 $[M+H]^+$.

[0360] 実施例２７６

4-クロロ-N-[(2-メトキシフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 14 mg, 0.0253 mmol, 33%)を得た。4-シアノアニリンの代わりに、o-アニシジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.17 (1H, s), 8.61 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.92 (1H, dd, J=7.8 Hz, 1.4 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.5 Hz), 7.13-7.09 (

2H, m), 7.06-7.02 (2H, m), 6.86 (1H, td, J=7.8, 1.4 Hz), 4.84-4.78 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.86 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.18-3.10 (1H, m), 2.20-2.09 (2H, m), 1.99-1.91 (1H, m).

ESI-MS m/z: 557 $[M+H]^+$.

[0361] 実施例２７７

4-クロロ-N-[(3-メトキシフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 39 mg, 0.0697 mmol, 91%)を得た。4-シアノアニリンの代わりに、m-アニシジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.72 (1H, s), 8.44 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.22-7.11 (4H, m), 7.04 (1H, d, J=11.2 Hz), 6.95 (1H, dd, J=8.3, 1.5 Hz), 6.66 (1H, ddd, J=8.3, 2.4, 0.7 Hz), 4.83-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.71 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.16-3.10 (1H, m), 2.19-2.10 (2H, m), 2.04-1.98 (1H, m).

ESI-MS m/z: 557 $[M+H]^+$.

[0362] 実施例２７８

4-クロロ-N-[(3-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 42 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。4-シアノアニリンの代わりに、3-シアノアニリンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.95 (1H, s), 8.73 (1H, d, J=6.8 Hz), 8.03 (1H, s), 7.72 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.54-7.47 (2H, m), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.12 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.80-4.74 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.20-3.11 (1H, m), 2.21-2.12 (2H, m), 2.04-1.98 (1H, m).

ESI-MS m/z: 552 $[M+H]^+$.

[0363] 実施例２７９

4-クロロ-N-[(3,4-ジメトキシフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 36 mg, 0.0613 mmol, 80%)を得た。4-シアノアニリンの代わりに、4-アミノベラトロールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.57 (1H, s), 8.20 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.10 (1H, s), 7.09 (1H, d, J=2.4 Hz), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.90 (1H, d, J=8.5 Hz), 6.83 (1H, dd, J=8.5, 2.4 Hz), 4.87-4.81 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.73 (3H, s), 3.72 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.15-3.09 (1H, m), 2.16-2.01 (3H, m).

ESI-MS m/z: 587 $[M+H]^+$.

[0364] 実施例２８０

4-クロロ-N-[(2-クロロフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 36 mg, 0.0536 mmol, 70%)を得た。4-シアノアニリンの代わりに、2-クロロアニリンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.34 (1H, s), 8.71 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.62 (1H, dd, J=7.7, 1.5 Hz), 7.48 (1H, dd, J=7.7, 1.5 Hz), 7.29 (1H, td, J=7.7, 1.5 Hz), 7.21 (1H, td, J=7.7, 1.5 Hz), 7.16 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.15 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.82-4.75 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.18-3.10 (1H, m), 2.20-1.96 (3H, m).

ESI-MS m/z: 561 $[M+H]^+$.

[0365] 実施例２８１

4-クロロ-N-[(3-クロロフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの

OnCusp
Ex. 1038

合成

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 40 mg, 0.0712 mmol, 93%)を得た。4-シアノアニリンの代わりに、3-クロロアニリンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.86 (1H, s), 8.63 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.74-7.73 (1H, m), 7.34-7.29 (2H, m), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.14-7.11 (2H, m), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.79-4.73 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.19-3.10 (1H, m), 2.20-1.97 (3H, m).

ESI-MS m/z: 561 $[M+H]^+$.

[0366] 実施例２８２

4-クロロ-N-[(4-クロロフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 43 mg, 0.0766 mmol, 定量的)を得た。4-シアノアニリンの代わりに、4-クロロアニリンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.79 (1H, s), 8.53 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.48 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.34 (2H, d, J=8.8 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.80-4.73 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.61 (3H, s), 3.18-3.10 (1H, m), 2.19-1.97 (3H, m).

ESI-MS m/z: 561 $[M+H]^+$.

[0367] 実施例２８３

4-クロロ-N-[(2-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

2-シアノアニリン(14 mg, 0.0766×1.5 mmol)のジクロロメタン-水(1:1, 3 mL)溶液に、室温でチオホスゲン(8.75 μL, 0.0766×1.5 mmol)を添加して3時間撹拌した。反応液に、4-クロロデアセチルコルヒチン(30 mg, 0.0766 mmol)のジクロロメタン(0.5 mL)溶液、および、炭酸ナトリウム(12 mg, 0.0766

OnCusp
Ex. 1038

×1.5 mmol)の水(0.5 mL)溶液を加えて、室温で40分間撹拌した。反応液にクロロホルムとブラインを加えて、有機層を取った。有機層は無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 19 mg, 0.0345 mmol, 45%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.77 (1H, s), 8.87 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.79 (1H, dd, J=7.7, 1.3 Hz), 7.66-7.57 (2H, m), 7.35 (1H, td, J=7.7, 1.3 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.14 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.19-3.10 (1H, m), 2.17-1.98 (3H, m).

ESI-MS m/z: 552 $[M+H]^+$.

[0368] 参考例２７

イミダゾール-1-チオカルボン酸 チアゾール-2-イルアミドの合成

2-アミノチアゾール(1.00 g, 9.99 mmol)のアセトニトリル(10 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にて、1,1'-チオカルボニルジイミダゾール(1.78 g, 9.99 mmol)を添加し、40℃で2時間撹拌した(懸濁液となった)。反応液を5℃付近で数時間静置した後、析出物をろ取した。ろ取物を冷アセトニトリル、次いでヘキサンにて洗浄、減圧乾燥して、標記の化合物(淡黄色固体, 1.37 g, 6.49 mmol, 65%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.64 (1H, s), 7.95 (1H, t, J=1.2 Hz), 7.75 (1H, d, J=4.4 Hz), 7.31 (1H, dd, J=4.1 Hz), 7.07 (1H, s).

[0369] 実施例２８４

4-クロロ-N-[(チアゾール-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

7-アミノデアセチルコルヒチン(30 mg, 0.0766 mmol)のアセトニトリル(1.5 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にてイミダゾール-1-チオカルボン酸 チアゾール-2-イルアミド(18 mg, 0.0766×1.1 mmol)を添加して、1時間煮沸還流した。反応液を室温まで冷却した後、酢酸エチルと10%硫酸水素ナ

トリウム水溶液を添加して、有機層を取った。有機層は、10%硫酸ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いでブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 38 mg, 0.0710 mmol, 93%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.44 (1H, br-s), 7.20-7.01 (4H, m), 4.76-4.69 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.20-3.13 (1H, m), 2.23-1.98 (3H, m).

ESI-MS m/z: 534 $[M+H]^+$.

[0370] 実施例２８５

4-クロロ-N-(チオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-イソチオシアネートデ(アセチルアミノ)コルヒチン(26 mg, 0.0599)の1,4-ジオキサン(1 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にてアンモニア(0.5mol/L in 1,4-ジオキサン, 240 μL, 0.0599×2 mmol)を添加して、一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(淡褐色固体, 16 mg, 0.0345 mmol, 45%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.29 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.14 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=11.0 Hz), 4.70-4.63 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J=12.4, 4.1 Hz), 2.17-2.01 (2H, m), 1.89-1.81 (1H, m).

[0371] 実施例２８６

4-クロロ-N-(メチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(63 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間撹拌した。そこへメチルアミン塩酸塩(22 mg, 0.16×2 mmol)、トリエチルアミン(0.045mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で2日間撹拌した。反応後、溶媒を留去した。

OnCusp
Ex. 1038

残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 58 mg, 77.9%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.09 (1H, br s), 7.46 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.07 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.82-4.73 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.14-3.09 (1H, m), 2.82 (3H, d, J = 4.4 Hz), 2.16-1.85 (3H, m).

ESI-MS m/z: 465 $[M+H]^+$.

[0372] 実施例２８７

4-クロロ-N-(n-プロピルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(63 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへプロピルアミン(0.026 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 54 mg, 68.5%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.97 (1H, br s), 7.54 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.81-4.71 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.30-3.21 (2H, m), 3.12 (1H, dd, J = 12.9, 5.1 Hz), 2.17-1.81 (3H, m), 1.51-1.42 (2H, m), 0.84 (3H, t, J = 7.4 Hz).

ESI-MS m/z: 493 $[M+H]^+$.

[0373] 実施例２８８

4-クロロ-N-(n-ブチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(64 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そ

OnCusp
Ex. 1038

こへブチルアミン(0.032 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 55 mg, 67.8%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.96 (1H, br s), 7.51 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.80-4.70 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.42-3.35 (1H, m), 3.30-3.26 (1H, m), 3.12 (1H, dd, J = 12.6, 5.0 Hz), 2.17-1.81 (3H, m), 1.47-1.40 (2H, m), 1.30-1.24 (2H, m), 0.86 (3H, t, J = 7.3 Hz).

ESI-MS m/z: 507 $[M+H]^+$.

[0374] 実施例２８９

4-クロロ-N-(tert-ブチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(59 mg, 0.15 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.15×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.15×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへtert-ブチルアミン(0.031 mL, 0.15×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 57 mg, 74.9%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.89 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.35 (1H, s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.01 (2H, m), 4.75-4.69 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.13-3.08 (2H, m), 2.16-2.01 (2H, m), 1.81-1.74 (1H, m), 1.37 (9H, s).

ESI-MS m/z: 507 $[M+H]^+$.

[0375] 実施例２９０

4-クロロ-N-(シクロペンチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエ

チルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへシクロペンチルアミン(0.032 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 72 mg, 86.7%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.80 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.62 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.79-4.70 (1H, m), 4.31-4.23 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.13-3.09 (1H, m), 2.15-2.03 (2H, m), 1.91-1.82 (3H, m), 1.66-1.47 (4H, m), 1.42-1.33 (2H, m).

ESI-MS m/z: 519 $[M+H]^+$.

[0376] 実施例２９１

4-クロロ-N-(イソプロピルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(65 mg, 0.165 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.165×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.165×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへイソプロピルアミン塩酸塩(32 mg, 0.165×2 mmol)、トリエチルアミン(0.046 mL, 0.165×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 75 mg, 92.2%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.85 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.44 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05-7.01 (2H, m), 4.79-4.71 (1H, m), 4.18-4.10 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.13-3.08 (1H, m), 2.16-1.80 (3H, m), 1.09 (6H, t, J = 6.8 Hz).

ESI-MS m/z: 493 $[M+H]^+$.

[0377] 実施例２９２

4-クロロ-N-(n-ヘキシルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへn-ヘキシルアミン(0.042 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 54 mg, 63.1%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.98 (1H, br s), 7.51 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05-7.01 (2H, m), 4.81-4.69 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.31-3.23 (2H, m), 3.14-3.09 (1H, m), 2.17-1.80 (3H, m), 1.30-1.21 (8H, m), 0.85 (3H, t, J = 6.8 Hz).

ESI-MS m/z: 535 $[M+H]^+$.

[0378] 実施例２９３

4-クロロ-N-[(trans-4-ヒドロキシシクロヘキシル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへtrans-4-アミノシクロヘキサノール(37 mg, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 64 mg, 72.8%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.90 (1H, br s), 7.47 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.01 (2H, m), 4.77-4.69 (1H, m), 4.53 (1H, d, J = 4.4 Hz), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.82-3.74 (1H, m), 3.60 (3H, s), 3.41-3.36 (1H, m), 2.16-2.03 (2H, m), 1.89-1.74 (5H, m), 1.30-1.23 (3H, m), 1.14-1.07 (1H, m).

ESI-MS m/z: 549 $[M+H]^+$.

OnCusp
Ex. 1038

[0379] 実施例２９４

4-クロロ-N-[2-(ジメチルアミノ)エチルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへジメチルアミノエチルアミン(0.035 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 34 mg, 63.1%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.33 (1H, br s), 7.47 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.01 (2H, m), 4.76-4.69 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.50-3.36 (2H, m), 3.14-3.07 (1H, m), 2.44-2.32 (1H, m), 2.19 (6H, s), 2.14-2.02 (2H, m), 1.88-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 522 $[M+H]^+$.

[0380] 実施例２９５

4-クロロ-N-[(2-ヒドロキシエチル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへヒドロキシエチルアミン(0.019 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 15 mg, 18.9%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.19 (1H, br s), 7.60 (1H, br s), 7.15 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.82 (1H, s), 4.75 (1H, s), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.49-3.42 (3H, m), 3.39-3.35 (1H, m),

OnCusp
Ex. 1038

3.14-3.09 (1H, m), 2.17-2.03 (2H, m), 1.89-1.77 (1H, m).

ESI-MS m/z: 495 $[M+H]^+$.

[0381] 実施例２９６

4-クロロ-N-[(4-メトキシフェニル) チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへp-アニシジン(39 mg, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 64 mg, 71.8%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 9.50 (1H, s), 8.20 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.27 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.15 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.88 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.83-4.77 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.73 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.15-3.10 (1H, m), 2.16-1.96 (3H, m).

ESI-MS m/z: 557 $[M+H]^+$.

[0382] 実施例２９７

4-クロロ-N-[(p-トルイル) チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへp-トルイルイソチオシアネート(29 mg, 0.16×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.033 mL, 0.16×1.5 mmol)を加えて、室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 80 mg, 92.4%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 9.60 (1H, s), 8.31 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.30 (2H, d, J = 8.1 Hz), 7.17-7.09 (4H, m), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.82-4

.77 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.61 (3H, s), 3.15-3.08 (1H, m), 2.26 (3H, s), 2.15-1.97 (3H, m).

ESI-MS m/z: 541 $[M+H]^+$.

[0383] 実施例２９８

4-クロロ-N-(シクロプロピルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへシクロヘキシルイソチオシアネート(19 mg, 0.16×1.2 mmol)、トリエチルアミン(0.033 mL, 0.16×1.5 mmol)を加えて、室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 75 mg, 95.5%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.05 (1H, br s), 7.90 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.16-7.12 (2H, m), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.88-4.79 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.16-3.10 (1H, m), 2.74-2.68 (1H, m), 2.17-2.02 (3H, m), 0.78-0.67 (2H, m), 0.57-0.45 (2H, m).

ESI-MS m/z: 491 $[M+H]^+$.

[0384] 実施例２９９

4-クロロ-N-(アリルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへアリルアミン(0.024 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 33 mg, 42.0%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.12 (1H, br s), 7.67 (1H, br s), 7.15 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.07 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.86-5.76 (1H, m

OnCusp
Ex. 1038

), 5.13 (1H, d, J = 17.3 Hz), 5.07 (1H, d, J = 10.2 Hz), 4.79-4.72 (1H, m), 4.03-3.99 (2H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.14-3.09 (1H, m), 2.17-1.82 (3H, m).

ESI-MS m/z: 491 $[M+H]^+$.

[0385] 実施例３００

4-クロロ-N-[(1-メチルピペリジン-4-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへ4-アミノ-1-メチルピペリジン(37 mg, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 59 mg, 67.3%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-D_6) δ: 8.08 (1H, br s), 7.84 (1H, br s), 7.15 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.76-4.66 (1H, m), 4.03-3.96 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.16-3.01 (3H, m), 2.55-2.48 (5H, m), 2.17-1.86 (5H, m), 1.65-1.49 (2H, m).

ESI-MS m/z: 548 $[M+H]^+$.

[0386] 実施例３０１

4-クロロ-N-(シクロヘプチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへシクロヘプチルアミン(0.041 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 73 mg, 83.4%)を得た。

OnCusp
Ex. 1038

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.84 (1H, br s), 7.53 (1H, br s), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.76-4.67 (1H, m), 4.09-4.03 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.14-3.08 (1H, m), 2.16-2.04 (2H, m), 1.85-1.77 (3H, m), 1.58-1.35 (10H, m).

ESI-MS m/z: 547 $[M+H]^+$.

[0387] 実施例３０２

4-クロロ-N-[(2-メトキシエチル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへメトキシエチルアミン(0.028 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)、さらにPLC(Merck, Silicagel 60 F_{254}, 2mm)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 23 mg, 28.2%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.26 (1H, br s), 7.70 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.01 (2H, m), 4.79-4.70 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.49-3.37 (4H, m), 3.26 (3H, s), 3.14-3.09 (1H, m), 2.14-1.80 (3H, m).

ESI-MS m/z: 509 $[M+H]^+$.

[0388] 実施例３０３

4-クロロ-N-[(2,2,2-トリフルオロエチル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへ2,2,2-トリフルオロエチルアミン(0.025 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室

温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 35 mg, 41.0%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.51 (1H, d, J = 6.8 Hz), 8.00 (1H, s), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.76-4.70 (1H, m), 4.49-4.38 (1H, m), 4.34-4.25 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.60 (3H, s), 3.15-3.10 (1H, m), 2.19-2.08 (2H, m), 1.96-1.86 (1H, m).

ESI-MS m/z: 533 $[M+H]^+$.

[0389] 実施例３０４

4-クロロ-N-[(インダン-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへ2-アミノインダン(0.042 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 70 mg, 77.1%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.91-7.85 (2H, br m), 7.26-7.21 (2H, m), 7.18-7.14 (3H, m), 7.05-7.02 (2H, m), 4.80-4.72 (2H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.25-3.17 (2H, m), 3.13-3.09 (1H, m), 2.82-2.74 (2H, m), 2.16-1.76 (3H, m).

ESI-MS m/z: 567 $[M+H]^+$.

[0390] 実施例３０５

4-クロロ-N-[(4-スルファモイルフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへ4-イソチオシアネートベンゼンスルホンアミド(41 mg

, 0.16×1.2mmol)、トリエチルアミン(0.033L, 0.16×1.5 mmol)を加えて、室温で一晩攪拌した。反応後、クロロホルムを加えて1 mol/L塩酸で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 84 mg, 86.6%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 10.00 (1H, s), 8.71 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.72-7.65 (4H, m), 7.26 (2H, s), 7.17 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.13 (1H, s), 7.05 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.80-4.74 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.15 (1H, d, J = 7.1 Hz), 2.23-2.12 (2H, m), 2.06-1.97 (1H, m).

ESI-MS m/z: 606 $[M+H]^+$.

[0391] 実施例３０６

4-クロロ-N-[(3,5-ジメチルイソオキサゾール-4-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-アミノ-3,5-ジメチルオキサゾール(27 mg, 0.16×1.5 mmol)をジクロロメタン(1 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.018 mL, 0.16×1.5 mmol)、トリエチルアミン(0.067 mL, 0.16×3 mmol)を加えて、室温で2時間攪拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 97 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.08-7.02 (2H, m), 4.85-4.75 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.11-3.06 (1H, m), 2.33-2.24 (1H, m), 2.21 (3H, s), 2.14-2.08 (3H, m), 2.04 (3H, s).

ESI-MS m/z: 546 $[M+H]^+$.

[0392] 実施例３０７

4-クロロ-N-[(4-ヒドロキシフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチ

ンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.3 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへp-ヒドロキシアニリン(35 mg, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 79 mg, 90.9%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 9.42 (1H, br s), 9.37 (1H, s), 8.10 (1H, d, J = 6.1 Hz), 7.16-7.10 (4H, m), 7.03 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.71 (1H, s), 6.69 (1H, s), 4.83-4.77 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.61 (3H, s), 3.13-3.09 (1H, m), 2.16-1.99 (3H, m).

ESI-MS m/z: 543 $[M+H]^+$.

[0393] 実施例３０８

4-クロロ-N-[(5-メチルピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

3-アミノ-5-メチルピラゾール(23 mg, 0.16×1.5 mmol)をジクロロメタン(1 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.018 mL, 0.16×1.5 mmol)、トリエチルアミン(0.067 mL, 0.16×3 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン(62 mg, 0.16 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 73 mg, 85.9%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 12.36 (1H, s), 10.59 (1H, br s), 10.46 (1H, br s), 7.18 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.96 (1H, s), 5.73 (1H, s), 4.86-4.80 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.18-3.08 (1H, m), 2.27-2.16 (5H, m), 1.96-1.90 (1H, m).

ESI-MS m/z: 531 $[M+H]^+$.

OnCusp
Ex. 1038

[0394] 実施例３０９

4-ブロモ-N-(プロピルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへプロピルアミン(0.026 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 68 mg, 79.1%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.00 (1H, br s), 7.55 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.79-4.68 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.32-3.21 (2H, m), 3.14-3.09 (1H, m), 2.25-2.17 (1H, m), 2.09-1.78 (2H, m), 1.48-1.44 (2H, m), 0.84 (3H, t, J = 7.3 Hz).

ESI-MS m/z: 537 $[M+H]^+$, 539$[M+2+H]^+$.

[0395] 実施例３１０

4-ブロモ-N-(ブチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへブチルアミン(0.032 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 55 mg, 62.3%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.99 (1H, br s), 7.52 (1H, br s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.79-4.66 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.32-3.26 (2H, m), 3.14-3.10 (1H, m), 2.25-2.17 (1H, m), 2.09-2.01 (1H, m), 1.90-1.76 (1H, m), 1.47-1

OnCusp
Ex. 1038

.40 (2H, m), 1.32-1.28 (2H, m), 0.86 (3H, t, J = 7.1 Hz).

ESI-MS m/z: 551 $[M+H]^+$, 553$[M+2+H]^+$.

[0396] 実施例３１１

4-ブロモ-N-[(2,2,2-トリフルオロエチル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへ2,2,2-トリフルオロエチルアミン(0.025 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 17 mg, 18.4%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.54 (1H, d, J = 7.1 Hz), 8.03 (1H, s), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05-7.02 (2H, m), 4.74-4.68 (1H, m), 4.48-4.38 (1H, m), 4.34-4.25 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.12-3.11 (1H, m), 2.27-2.19 (1H, m), 2.14-2.06 (1H, m), 1.94-1.85 (1H, m).

ESI-MS m/z: 577 $[M+H]^+$, 579$[M+2+H]^+$.

[0397] 実施例３１２

4-ブロモ-N-(シクロペンチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへシクロペンチルアミン(0.027 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 45 mg, 52.4%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.82 (1H, d, J = 5.4 Hz), 7.63 (1H, br s), 7.14 (

1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.01 (2H, m), 4.78-4.68 (1H, m), 4.31-4.23 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.14-3.11 (1H, m), 2.25-2.17 (1H, m), 2.09-2.01 (1H, m), 1.91-1.83 (3H, m), 1.67-1.59 (2H, m), 1.54-1.47 (2H, m), 1.41-1.33 (2H, m).

ESI-MS m/z: 563 $[M+H]^+$, 565$[M+2+H]^+$.

[0398] 実施例３１３

4-ブロモ-N-(シクロヘキシルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへシクロヘキシルアミン(0.037 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 54 mg, 58.4%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.86 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.48 (1H, s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.01 (2H, m), 4.77-4.67 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J = 13.3, 5.5 Hz), 2.25-2.17 (1H, m), 2.10-2.01 (1H, m), 1.86-1.78 (3H, m), 1.67-1.60 (2H, m), 1.55-1.50 (1H, m), 1.28-1.18 (6H, m).

ESI-MS m/z: 577 $[M+H]^+$, 579$[M+2+H]^+$.

[0399] 実施例３１４

4-ブロモ-N-[(4-メトキシフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへp-アニシジン(39 mg, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage

Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 28 mg, 29.1%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 9.51 (1H, s), 8.21 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.28 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.88 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.82-4.75 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.73 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J = 13.1, 5.5 Hz), 2.26-2.17 (1H, m), 2.14-2.05 (1H, m), 2.02-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 601 $[M+H]^+$, 603$[M+2+H]^+$.

[0400] 実施例３１５

4-ブロモ-N-{[2-(4-モルホリノ)エチル]チオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへ2-(4-モルホリノ)エチルアミン(0.042 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 37 mg, 38.0%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.49 (1H, s), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.04-7.02 (2H, m), 4.77-4.67 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.63-3.56 (7H, m), 3.50-3.42 (2H, m), 3.15-3.06 (3H, m), 2.44-2.35 (4H, m), 2.26-2.17 (1H, m), 2.11-2.01 (1H, m), 1.92-1.79 (1H, m).

ESI-MS m/z: 608 $[M+H]^+$, 610$[M+2+H]^+$.

[0401] 実施例３１６

4-ブロモ-N-(N',N'-ジメチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4

mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへジメチルアミン塩酸塩(26 mg, 0.16×2 mmol)、トリエチルアミン(0.045 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 76 mg, 90.7%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.63 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.08 (1H, s), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.89-4.83 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.20 (6H, s), 3.15-3.10 (1H, m), 2.24-2.16 (2H, m), 2.05-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 523 $[M+H]^+$, 525$[M+2+H]^+$.

[0402] 実施例３１７

4-ブロモ-N-(N'-エチル-N'-メチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへエチルメチルアミン(0.027 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 78 mg, 90.7%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.58 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.07 (1H, s), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.92-4.86 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.29 (2H, s), 3.15 (3H, s), 2.26-2.16 (2H, m), 2.02-1.95 (1H, m), 1.04 (3H, t, J = 7.0 Hz).

ESI-MS m/z: 537 $[M+H]^+$, 539$[M+2+H]^+$.

[0403] 実施例３１８

4-ブロモ-N-[(4-メチルピペリジン-1-イル)チオカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへ4-メチルピペリジン(0.038 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 73 mg, 79.0%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.88 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.92-4.86 (1H, m), 4.65 (2H, dd, J = 30.7, 13.0 Hz), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J = 12.4, 5.9 Hz), 2.98 (2H, q, J = 13.0 Hz), 2.24-2.14 (2H, m), 2.03-1.93 (1H, m), 1.28-1.23 (2H, m), 1.09-0.94 (2H, m), 0.89 (3H, d, J = 6.3 Hz), 0.86-0.84 (1H, m).

ESI-MS m/z: 577 $[M+H]^+$, 579$[M+2+H]^+$.

[0404] 実施例３１９

4-ブロモ-N-[(4,4-ジフルオロ-ピペリジン-1-イル)チオカルボニル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(70 mg, 0.16 mmol)をジクロロメタン(1.4 mL)に溶解した。そこへチオホスゲン(0.013 mL, 0.16×1.05 mmol)、トリエチルアミン(0.054 mL, 0.16×2.4 mmol)を加えて、室温で1時間攪拌した。そこへ4,4-ジフルオロピペリジン塩酸塩(50 mg, 0.16×2 mmol)、トリエチルアミン(0.045 mL, 0.16×2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 82 mg, 85.5%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.23 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.85-4.79 (1H, m), 4.04-3.98 (2H, m), 3.94-3.91 (2H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J = 12.6, 5.2 Hz), 2.25-2.13 (2H, m), 2.08-1.92 (5H, m).

ESI-MS m/z: 599 $[M+H]^+$, 601$[M+2+H]^+$.

[0405] 参考例２８

3-イソチオシアネート-5メチルイソオキサゾールの合成

3-アミノ-5-メチルイソオキサゾール(326 mg, 3.3 mmol)をジクロロメタン(6.5 mL)に溶解し、氷冷した。そこへチオホスゲン(0.278 mL, 3.3×1.1 mmol)、炭酸ナトリウム水溶液(769 mg, 3.3×2.2 mmol, 4 mL)を加えて室温で2.5時間攪拌した。反応後、クロロホルムを加えて飽和食塩水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色オイル, 255 mg, 55.1%)を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 5.97 (1H, t, J = 0.9 Hz), 2.43 (3H, t, J = 0.9 Hz).

ESI-MS m/z: 141 $[M+H]^+$.

[0406] 実施例３２０

4-クロロ-N-[(5-メチルイソオキサゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

3-イソチオシアネート-5メチルイソオキサゾール(32 mg, 0.19×1.2 mmol)をジクロロメタンに溶解した。そこへ4-クロロデアセチルコルヒチン(75 mg, 0.19 mmol)、トリエチルアミン(0.04 mL, 0.19×1.5 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 98 mg, 80.0%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 9.20 (1H, s), 7.17 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.13 (1H, s), 7.05 (1H, d, J = 10.5 Hz), 4.25-4.14 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.88 (6H, s), 3.54 (3H, s), 3.15 (1H, dd, J = 12.8, 4.8 Hz), 2.28-2.12 (

2H, m), 1.93 (3H, s), 1.91-1.83 (1H, m).

ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$.

[0407] 参考例２９

イミダゾール-1-カルボチオ酸 (5-メチル-１，２，４－トリアゾール-3-イル)-アミドの合成

3-アミノ-5メチルー１，２，４－トリアゾール(265 mg, 2.7 mmol)をアセトニトリル(2.7 mL)に溶解した。そこへチオカルボニルジイミダゾール(481 mg, 2.7 mmol)を加えて室温で2時間攪拌した。反応後、沈殿物をろ過し、アセトニトリルで洗った。ろ過物を減圧乾燥することで標記の化合物(黄色固体, 377 mg, 67.1%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.41 (1H, t, J = 1.1 Hz), 8.26 (2H, br s), 7.83 (1H, t, J = 1.5 Hz), 7.05 (1H, dd, J = 1.5, 1.1 Hz), 2.12 (3H, s).

ESI-MS m/z: 209 $[M+H]^+$.

[0408] 実施例３２１

4-クロロ-N-[(5-メチルー１，２，４－トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(61 mg, 0.156 mmol)をDMF(2 mL)に溶解した。そこへイミダゾール-1-カルボチオ酸 (5-メチル-１，２，４－トリアゾール-3-イル)-アミド(36 mg, 0.156×1.1 mmol)を加えて60℃で2時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。酢酸エチルを加えて飽和重曹水、飽和食塩水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 46 mg, 55.4%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 10.32 (1H, d, J = 7.3 Hz), 8.06 (2H, br s), 7.19 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.07-7.04 (2H, m), 4.82-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.15 (1H, dd, J = 12.9, 5.4 Hz), 2.60-2.53 (1H, m), 2.20 (3H, s), 2.18-1.99 (2H, m). ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$.

[0409] 参考例３０

3-イソチオシアネートイソオキサゾールの合成

3-アミノイソオキサゾール(247 mg, 2.94 mmol)をジクロロメタン(5 mL)に溶解し、氷冷した。チオホスゲン(0.248 mL, 2.94×1.1 mmol)、炭酸ナトリウム水溶液(686 mg, 2.94×2.2 mmol, 3.4 mL)を加えて氷冷下2時間攪拌した。反応後、クロロホルムを加えて飽和重曹水、飽和食塩水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色オイル, 110 mg, 29.7%)を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 8.40 (1H, dd, J = 1.7, 0.7 Hz), 6.33 (1H, dd, J = 2.0, 0.7 Hz).

[0410] 実施例３２２

4-クロロ-N-[(イソオキサゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(188 mg, 0.48 mmol)をアセトニトリル(3 mL)に溶解した。そこへ3-イソチオシアネートイソオキサゾール(105 mg, 0.48×1.7 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。さらにDMF(3 mL)を加えて80℃で4時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。酢酸エチルを加えて、0.1 mol/L塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 87 mg, 35.0%)を得た。

ESI-MS m/z: 518 $[M+H]^+$.

[0411] 実施例３２３

4-クロロ-N-[(１, ２, ４－トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-(イソチオシアネートデアセチルアミド)コルヒチン(72 mg, 0.166 mmol)をDMF(1 mL)に溶解した。そこへ3-アミノ－１, ２, ４－トリアゾ

ール(17 mg, 0.166×1.2 mmol)を加えて80℃で1時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムを加えて飽和重曹水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 27 mg, 31.4%)を得た。

ESI-MS m/z: 518 $[M+H]^+$.

[0412] 実施例３２４

4-クロロ-N-[(3,4-ジメチルイソオキサゾール-５-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-(イソチオシアネートデアセチルアミド)コルヒチン(69 mg, 0.159 mmol)をDMF(1 mL)に溶解した。そこへ5-アミノ-3,4-ジメチルイソオキサゾール(21 mg, 0.159×1.2 mmol)を加えて80℃で4時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムを加えて飽和重曹水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 10 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 24 mg, 27.6%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 9.87 (1H, s), 8.81 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.10 (1H, s), 7.04 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.78-4.71 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.17-3.10 (1H, m), 2.13 (3H, s), 2.11-2.04 (3H, m), 1.73 (3H, s).

ESI-MS m/z: 546 $[M+H]^+$.

[0413] 実施例３２５

4-クロロ-N-[(4-シアノピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-(イソチオシアネートデアセチルアミド)コルヒチン(77 mg, 0.178 mmol)をDMF(1 mL)に溶解した。そこへ3-アミノ-4-シアノピラゾール(23 mg, 0.178×1.2 mmol)を加えて80℃で4時間攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムを加えて飽和重曹水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し

OnCusp
Ex. 1038

、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 41 mg, 42.5%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 13.60 (1H, s), 10.42 (1H, s), 9.31 (1H, d, J = 6.6 Hz), 8.57 (1H, s), 7.17 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06-7.04 (2H, m), 4.82-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.62 (3H, s), 3.14 (1H, d, J = 8.3 Hz), 2.19-2.14 (2H, m), 2.04-1.97 (1H, m).

ESI-MS m/z: 593 $[M+H]^+$.

[0414] 実施例３２６

4-クロロ-N-[(5-フェニルピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-(イソチオシアネートデアセチルアミド)コルヒチン(82 mg, 0.189 mmol)をDMF(1 mL)に溶解した。そこへ3-アミノ-5-フェニルピラゾール(36 mg, 0.189×1.2 mmol)を加えて80℃で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムを加えて飽和重曹水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 113 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 13.17 (1H, s), 10.75 (1H, s), 10.33 (1H, s), 7.73 (2H, d, J = 7.6 Hz), 7.50-7.46 (2H, m), 7.40 (1H, t, J = 7.3 Hz), 7.19 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.03 (1H, s), 6.33 (1H, s), 4.90-4.84 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.19-3.17 (1H, m), 2.33-2.19 (2H, m), 1.99-1.93 (1H, m).

ESI-MS m/z: 546 $[M+H]^+$.

[0415] 参考例３１

4-ヨードコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、コルヒチン(4.47 g, 11.2 mmol) を酢酸 (56 mL) に溶解した。そこへN-ヨードこはく酸イミド (8.81 g, 11.2 × 3.5 mmol) を加

え、70℃で4時間撹拌した。反応液を冷却し、エバポレーターにて酢酸を留去した。得られた残渣に飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を溶液が黄色になるまで加え、飽和重曹水で中和し、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 100 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 4.10 g, 7.80 mmol, 70%,）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.64 (1H, s), 7.44 (1H, d, J = 5.9 Hz), 7.33 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.91 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.55-4.49 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.18 (1H, dd, J = 13.3, 4.8 Hz), 2.45-2.37 (1H, m), 2.34-2.25 (1H, m), 2.01 (3H, s), 1.85-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 526 ([M+H]$^+$)

[0416] 実施例３２７

N-(t-ブチルオキシカルボニル)-4-ヨードコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードコルヒチン（4.10 g, 7.80 mmol）をアセトニトリル（78 mL）に溶解した。そこへ4-ジメチルアミノピリジン（953 mg, 7.80 × 1 mmol), トリエチルアミン（3.2 mL, 7.80 × 3 mmol)、二炭酸ジ-tert-ブチル（8.52 g, 7.80 × 5 mmol）を加え、終夜加熱還流した。反応液を冷却し、飽和クエン酸水溶液を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 100 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 3.42 g, 5.47 mmol, 70%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.62 (1H, s), 7.17 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.79 (1H, d, J = 10.5 Hz), 5.06-5.01 (1H, m), 3.99 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.24 (1H, dd, J = 13.4, 5.6 Hz), 2.64-2.47 (2H, m), 2.32 (3H, s), 1.98-1.90 (1H, m), 1.57 (9H, s).

ESI-MS m/z: 626 ([M+H]+)

[0417] 実施例３２８

N-(t-ブチルオキシカルボニル)-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、N-(t-ブチルオキシカルボニル)-4-ヨードコルヒチン（801 mg, 1.28 mmol）をメタノール（6 mL）に溶解した。そこへナトリウムメトキシド（138 mg, 1.28 × 2 mmol）を加え、室温で1時間撹拌した。反応液に飽和食塩水を加えクエンチし、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 50 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡褐色固体, 535 mg, 0.917 mmol, 72%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.55 (1H, s), 7.21 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.81 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.96 (1H, d, J = 7.3 Hz), 4.30-4.24 (1H, m), 4.01 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.15 (1H, dd, J = 13.8, 4.5 Hz), 2.45-2.37 (1H, m), 2.31-2.19 (1H, m), 1.61-1.54 (1H, m), 1.38 (9H, s).

ESI-MS m/z: 584 ([M+H]+)

[0418] 実施例３２９

4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、N-(t-ブチルオキシカルボニル)-4-ヨードデアセチルコルヒチン（515 mg, 0.883 mmol）をトリフルオロ酢酸（1.3 mL）に溶解し、室温で3時間撹拌した。反応液を0℃に冷却し、1N 水酸化ナトリウム水溶液で塩基性にして、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 25 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 355 mg, 0.735 mmol, 83%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.65 (1H, s), 7.05 (1H, d, J= 10.5 Hz)

, 6.99 (1H, d, J = 10.7 Hz), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.55 (3H, s), 3.33-3.29 (1H, m), 2.95 (1H, dd, J = 13.5, 5.2 Hz), 2.34-2.26 (1H, m), 2.07-1.98 (1H, m), 1.98 (2H, br.s), 1.45-1.38 (1H, m).

ESI-MS m/z: 484 ($[M+H]^+$)

[0419] 実施例３３０

4-ヨード-N-プロピオニルデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (16 μl, 0.103 × 1.1 mmol)、プロピオニルクロリド (9 μl, 0.103 × 1 mmol) を加え、0℃で10分、次いで室温で1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 41 mg, 0.076 mmol, 74%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.54 (1H, s), 7.30 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.87 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.68 (1H, br.s), 4.56-4.50 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.18 (1H, dd, J = 13.7, 5.1 Hz), 2.46-2.37 (1H, m), 2.33-2.21 (1H, m), 2.29 (2H, q, J = 7.5 Hz), 1.78-1.71 (1H, m), 1.11 (3H, t, J = 7.6 Hz).

ESI-MS m/z: 540 ($[M+H]^+$)

[0420] 実施例３３１

N-シクロプロピルカルボニル-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (16 μl, 0.103 × 1.1 mmol)、シクロプロパンカルボニルクロリド (9 μl, 0.103 × 1.1 mmol) を加え、0℃で10分、次いで室温で1時間撹拌した

。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡褐色固体, 34 mg, 0.062 mmol, 60%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.66 (1H, s), 7.30 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.87 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.83 (1H, br.s), 4.58-4.52 (1H, m), 4.03 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.94 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.18 (1H, dd, J = 13.7, 4.6 Hz), 2.45-2.37 (1H, m), 2.33-2.24 (1H, m), 1.81-1.73 (1H, m), 1.58-1.49 (1H, m), 0.88-0.86 (2H, m), 0.74 (2H, d, J = 8.1 Hz).

ESI-MS m/z: 552 ([M+H]$^+$)

[0421] 実施例３３２

4-ヨード-N-(トリフルオロアセチル)デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.103 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリフルオロ酢酸無水物（29 μl, 0.103 × 2 mmol）を加え、0℃で2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 52 mg, 0.090 mmol, 87%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 8.72 (1H, br.s), 7.49 (1H, d, J = 3.2 Hz), 7.34 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.91 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.60-4.54 (1H, m), 4.04 (3H, s), 3.98 (3H, s), 3.96 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.24 (1H, dd, J = 13.1, 4.3 Hz), 2.48-2.34 (2H, m), 2.08-1.98 (1H, m).

ESI-MS m/z: 580 ([M+H]$^+$)

[0422] 実施例３３３

N-エチルスルホニル-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.103 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（21 μl, 0.103 × 1.5 mmol)、エタンスルホニルクロリド（12 μl, 0.103 × 1.2 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1 N 塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄褐色固体, 51 mg, 0.089 mmol, 86%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ [ppm]: 7.72 (1H, s), 7.24 (1H, d, J = 11.2 Hz), 6.84 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.20 (1H, br.s), 4.29-4.24 (1H, m), 4.02 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.58 (3H, s), 3.20 (1H, dd, J = 13.7, 4.4 Hz), 3.01-2.90 (2H, m), 2.45-2.29 (2H, m), 1.83-1.76 (1H, m), 1.32 (3H, t, J = 7.4 Hz).

ESI-MS m/z: 576 ($[M+H]^+$)

[0423] 実施例３３４

N-[3-(ジメチルアミノ)ベンゾイル]-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、3-ジメチルアミノ安息香酸（21 mg, 0.103 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（24 mg, 0.103 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物（17 mg, 0.103 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.103 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、0.1N 塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 41 mg, 0.065 mmol, 63%）を得た。

OnCusp
Ex. 1038

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.96 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.30 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.23 (1H, d, J = 6.6 Hz), 7.20 (1H, s), 7.17-7.13 (1H, m), 7.15 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J = 11.0 Hz), 6.93 (1H, d, J = 7.3 Hz), 4.45-4.39 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 13.9, 4.9 Hz), 2.94 (6H, s), 2.44-2.33 (1H, m), 2.12-1.96 (2H, m).

ESI-MS m/z: 631 ([M+H]$^+$)

[0424] 実施例３３５

4-ヨード-N-(4-メトキシベンゾイル) デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (16 μl, 0.103 × 1.1 mmol)、4-メトキシベンゾイルクロリド (18 mg, 0.103 × 1 mmol) を加え、0℃で10分、次いで室温で3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1 N 塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (淡黄色固体, 46 mg, 0.075 mmol, 72%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.90 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.88 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.18 (1H, s), 7.14 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.04 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.02 (2H, d, J = 8.8 Hz), 4.45-4.39 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.81 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.10 (1H, dd, J = 13.8, 4.8 Hz), 2.44-2.33 (1H, m), 2.11-1.96 (2H, m).

ESI-MS m/z: 618 ([M+H]$^+$)

[0425] 実施例３３６

4-ヨード-N-(4-ニトロベンゾイル) デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミ

ン（16 μl, 0.103 × 1.1 mmol）、4-ニトロベンゾイルクロリド（19 mg, 0.103 × 1 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で3時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1 N 塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 54 mg, 0.085 mmol, 83%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.41 (1H, d, J = 7.1 Hz), 8.35 (1H, dd, J = 9.2, 2.2 Hz), 8.12 (1H, dd, J = 9.3, 2.3 Hz), 7.18 (1H, s), 7.16 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.06 (1H, d, J = 11.2 Hz), 4.47-4.41 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.14-3.09 (1H, m), 2.46-2.33 (1H, m), 2.09-2.03 (2H, m).

ESI-MS m/z: 633 ([M+H]$^+$)

[0426] 実施例３３７

N-(3,5-ジフルオロベンゾイル)-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.103 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（16 μl, 0.103 × 1.1 mmol）、3,5-ジフルオロベンゾイルクロリド（13 μl, 0.103 × 1 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1N 塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（褐色固体, 36 mg, 0.058 mmol, 56%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.19 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.63-7.58 (2H, m), 7.53-7.47 (1H, m), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.14 (1H, s), 7.05 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.43-4.37 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.14-3.09 (1H, m), 2.45-2.33 (1H, m),

2.07-2.01 (2H, m).

ESI-MS m/z: 624 ([M+H]+)

[0427] 実施例３３８

N-(3-シアノベンゾイル)-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (16 μl, 0.103 × 1.1 mmol)、3-シアノベンゾイルクロリド (17 mg, 0.103 × 1 mmol) を加え、0℃で10分、次いで室温で1時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1N 塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 44 mg, 0.072 mmol, 70%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.24 (1H, d, J = 7.1 Hz), 8.35 (1H, s), 8.16 (1H, dt, J = 7.9, 1.4 Hz), 8.04 (1H, dt, J = 7.8, 1.2 Hz), 7.72 (1H, t, J = 7.8 Hz), 7.16 (1H, s), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.45-4.39 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J = 11.8, 3.5 Hz), 2.46-2.33 (1H, m), 2.08-2.03 (2H, m)

ESI-MS m/z: 613 ([M+H]+)

[0428] 実施例３３９

N-(アセトキシアセチル)-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (100 mg, 0.207 mmol) をジクロロメタン (4 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (32 μl, 0.103 × 1.1 mmol)、アセトキシアセチルクロリド (22 μl, 0.103 × 1 mmol) を加え、0℃で10分、次いで室温で2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1N 塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾

燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（橙色固体, 73 mg, 0.125 mmol, 61%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, $CDCl_3$) δ[ppm]: 7.55 (1H, s), 7.33 (1H, d, J = 11.0 Hz), 7.20 (1H, br.s), 6.90 (1H, d, J = 10.7 Hz), 4.61 (1H, d, J = 15.6 Hz), 4.59-4.53 (1H, m), 4.55 (1H, d, J = 15.6 Hz), 4.03 (3H, s), 3.97 (3H, s), 3.95 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.21 (1H, dd, J = 13.5, 5.0 Hz), 2.47-2.39 (1H, m), 2.32-2.20 (1H, m), 2.18 (3H, s), 1.88-1.81 (1H, m).

ESI-MS m/z: 584 ([M+H]$^+$)

[0429] 実施例３４０

4-ヨード-N-(フェニルアセチル) デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.103 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（16 μl, 0.103 × 1.1 mmol)、フェニルアセチルクロリド（14 μl, 0.103 × 1 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1N 塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 20 mg, 0.033 mmol, 32%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.87 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.29-7.17 (5H, m), 7.16 (1H, s), 7.09 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.01 (1H, d, J = 11.2 Hz), 4.19-4.11 (1H, m), 3.88 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.55-.348 (2H, m), 3.48 (3H, s), 3.06 (1H, dd, J = 14.1, 5.4 Hz), 2.40-2.31 (1H, m), 1.96-1.88 (1H, m), 1.86-1.78 (1H, m).

ESI-MS m/z: 602 ([M+H]$^+$)

[0430] 実施例３４１

4-ヨード-N-プロピルデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.103 mmol）をジクロロメタン-酢酸（50/1, 2 mL）に溶解した。そこへプロピオンアルデヒド（7 μl, 0.103 × 0.95 mmol）を加え、室温で10分撹拌した。そこへ水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム（48 mg, 0.103 × 2.2 mmol）を加え、室温で終夜撹拌した。反応液に飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体, 31 mg, 0.059 mmol, 57%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.56 (1H, s), 7.09 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.00 (1H, d, J = 11.0 Hz), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.03-2.98 (1H, m), 2.96 (1H, dd, J = 14.1, 5.1 Hz), 2.33-2.19 (3H, m), 2.17-2.11 (1H, m), 2.09-2.00 (1H, m), 1.50-1.43 (1H, m), 1.39-1.30 (2H, m), 0.81 (3H, t, J = 7.4 Hz).

ESI-MS m/z: 526 ([M+H]$^+$)

[0431] 実施例３４２

N-(ヒドロキシアセチル)-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、N-アセトキシアセチル-4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.090 mmol）をメタノール（0.45 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへナトリウムメトキシド（2.4 mg, 0.103 × 0.5 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で1時間撹拌した。反応液に飽和食塩水を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 26 mg, 0.048 mmol, 53%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.52 (1H, d, J = 7.8 Hz), 7.15 (1H, s), 7.10 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.02 (1H, d, J = 11.0 Hz), 5.52 (1H, t,

J = 5.9 Hz), 4.29-4.22 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.85-3.82 (2H, m), 3.83 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.04 (1H, dd, J = 13.8, 5.5 Hz), 2.38-2.30 (1H, m), 2.07-1.99 (1H, m), 1.90-1.82 (1H, m).

ESI-MS m/z: 542 ($[M+H]^+$)

[0432] 実施例３４３

N-[1-(ベンジルオキシカルボニル)ピペリジン-4-イルカルボニル]-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、1-（ベンジルオキシカルボニル）ピペリジン-4-カルボン酸（33 mg, 0.103 × 1.2 mmol）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩（24 mg, 0.103 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物(17 mg, 0.103 × 1.2 mmol）を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.103 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、1N 塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 61 mg, 0.084 mmol, 81%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 8.59 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.38-7.28 (5H, m), 7.10 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.09 (1H, s), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 5.06 (2H, s), 4.18-4.12 (1H, m), 4.02-3.97 (2H, m), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.53 (3H, s), 3.04 (1H, dd, J = 13.5, 5.0 Hz), 2.91-2.77 (2H, m), 2.47-2.39 (1H, m), 2.37-2.30 (1H, m), 1.96-1.86 (1H, m), 1.83-1.77 (1H, m), 1.75-1.64 (2H, m), 1.42-1.31 (2H, m).

ESI-MS m/z: 729 ($[M+H]^+$)

[0433] 実施例３４４

4-ヨード-N-(ピリジン-4-イルカルボニル) デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、イソニコチン酸 (15 mg, 0.103 × 1.2 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (1 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへ1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩 (24 mg, 0.103 × 1.2 mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール一水和物 (17 mg, 0.103 × 1.2 mmol) を加え、0℃で30分撹拌した。そこへ4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) を加え、0℃で10分、次いで室温で終夜撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (淡黄色固体, 55 mg, 0.093 mmol, 91%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.34 (1H, d, J = 7.1 Hz), 8.75 (2H, dd, J = 4.4, 1.7 Hz), 7.78 (2H, dd, J = 4.4, 1.7 Hz), 7.16 (1H, s), 7.16 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J = 11.0 Hz), 4.46-4.39 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.85 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.14-3.09 (1H, m), 2.46-2.37 (1H, m), 2.08-2.02 (2H, m).

ESI-MS m/z: 589 ([M+H]$^+$)

[0434] 実施例３４５

N-フェニルスルホニル-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (21 μl, 0.103 × 1.5 mmol)、ベンゼンスルホニルクロリド (16 μl, 0.103 × 1.2 mmol) を加え、0℃で10分、次いで室温で2時間撹拌した。反応液に水を加えクエンチし、0.1 N 塩酸を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精

OnCusp
Ex. 1038

製し、標記の化合物（白色固体，41 mg，0.066 mmol，64%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，DMSO-d_6) δ[ppm]：8.59（1H，d，J = 7.3 Hz），7.57-7.50（3H，m），7.45-7.41（2H，m），7.24（1H，s），7.06（1H，d，J = 10.5 Hz），6.98（1H，d，J = 10.7 Hz），3.89（3H，s），3.87（3H，s），3.82（3H，s），3.54-3.47（1H，m），3.51（3H，s），2.86（1H，dd，J = 14.0，5.5 Hz），2.24-2.16（1H，m），1.68-1.61（1H，m），1.57-1.49（1H，m）.

ESI-MS m/z：624（$[M+H]^+$）

[0435] 実施例３４６

N-（シクロヘキシルチオカルバモイル）-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg，0.103 mmol）をジクロロメタン（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸シクロヘキシル（20 μl，0.103 × 2 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で終夜撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、0.1 N 塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP 10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（白色固体，26 mg，0.042 mmol，40%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，DMSO-d_6) δ[ppm]：7.85（1H，d，J = 6.8 Hz），7.49（1H，br.s），7.12（1H，d，J = 10.5 Hz），7.04（1H，s），7.02（1H，d，J = 11.0 Hz），4.72-4.64（1H，m），3.89（3H，s），3.89（3H，s），3.84（3H，s），3.59（3H，s），3.05（1H，dd，J = 13.3，6.0 Hz），2.40-2.32（1H，m），2.07-1.98（1H，m），1.85-1.77（3H，m），1.67-1.59（2H，m），1.55-1.49（1H，m），1.29-1.10（6H，m）.

ESI-MS m/z：625（$[M+H]^+$）

[0436] 実施例３４７

N-[4-（ジメチルアミノ）フェニルチオカルバモイル]-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg，0.103 mmol）

OnCusp
Ex. 1038

をジクロロメタン（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソチオシアン酸p-（ジメチルアミノ）フェニル(37 mg, 0.103 × 2 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で終夜撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、0.1 N 塩酸、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体, 32 mg, 0.048 mmol, 47%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.40 (1H, s), 8.00 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.15-7.09 (4H, m), 7.03 (1H, d, J = 11.2 Hz), 6.69 (1H, dd, J = 6.8, 2.2 Hz), 4.78-4.72 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.05 (1H, dd, J = 13.7, 4.9 Hz), 2.87 (6H, s), 2.39-2.31 (1H, m), 2.09-2.01 (1H, m), 1.99-1.92 (1H, m).

ESI-MS m/z: 662 ([M+H]$^+$)

[0437] 実施例３４８

N-(ベンジルカルバモイル)-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg, 0.103 mmol）をジクロロメタン（1.5 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへイソシアン酸ベンジル（26 μl, 0.103 × 1.2 mmol）を加え、室温に戻して2時間撹拌した。反応液に水を加え、クロロホルムで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（淡黄色固体, 53 mg, 0.086 mmol, 84%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.31-7.25 (3H, m), 7.21-7.17 (3H, m), 7.09 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.02 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.88 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.46 (1H, t, J = 6.0 Hz), 4.24-4.06 (3H, m), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3,83 (3H, s), 3.50 (3H, s), 3.03 (1H, dd, J = 13.8, 5.2 Hz), 2.38-2.29 (1H, m), 2.01-1.91 (1H, m), 1.71-1.64 (1H, m).

ESI-MS m/z: 617 ([M+H]+)

[0438] 実施例３４９

4-ヨード-N-[(ピペリジン-1-イル)カルボニル] デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン (5 mL) に溶解した。そこへトリエチルアミン (70 μl, 0.103 × 5 mmol)、ピペリジン-1-カルボニルクロリド (65 μl, 0.103 × 5 mmol) を加え、終夜加熱還流した。反応液に水を加えクエンチし、酢酸エチルを加え、10% クエン酸水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 21 mg, 0.035 mmol, 34%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.17 (1H, s), 7.09 (1H, d, J = 10.5 Hz), 7.01 (1H, d, J = 10.5 Hz), 6.99 (1H, d, J = 6.1 Hz), 4.15-4.09 (1H, m), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.83 (3H, s), 3.31-3.25 (4H, m), 3.06-3.01 (1H, m), 2.36-2.27 (1H, m), 1.91-1.85 (2H, m), 1.55-1.49 (2H, m), 1.42-1.36 (4H, m).

ESI-MS m/z: 595 ([M+H]+)

[0439] 実施例３５０

N-エチル-4-ヨードデアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン-酢酸 (50/1, 2 mL) に溶解した。そこへアセトアルデヒド (6 μl, 0.103 × 0.95 mmol) を加え、室温で10分撹拌した。そこへ水素化トリアセトキシホウ素ナトリウム (48 mg, 0.103 × 2.2 mmol) を加え、室温で終夜撹拌した。反応液に飽和重曹水を加え、クロロホルムで抽出した。クロロホルム層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記

の化合物（白色固体，32 mg，0.063 mmol，61%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，DMSO-d_6) δ[ppm]：7.55（1H，s），7.09（1H，d，J = 10.5 Hz），7.01（1H，d，J = 11.0 Hz），3.89（3H，s），3.88（3H，s），3.83（3H，s），3.49（3H，s），3.05-3.01（1H，m），2.96（1H，dd，J = 13.7，5.1 Hz），2.36-2.25（3H，m），2.23-2.15（1H，m），2.08-1.98（2H，m），1.49-1.42（1H，m），0.94（3H，t，J = 6.7 Hz）.

ESI-MS m/z：512（[M+H]$^+$）

[0440] 実施例３５１

4-ヨード-N-[(ピペリジン-1-イル)チオカルボニル] デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン（50 mg，0.103 mmol）をジクロロメタン（2 mL）に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン（34 μl，0.103 × 2.4 mmol）、チオホスゲン（8 μl，0.103 × 1.05 mmol）を加え、0℃で2時間撹拌した。そこへピペリジン（20 μl，0.103 × 2 mmol）を加え、0℃で10分、次いで室温で2時間撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10% クエン酸水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Biotage Isolera One，SNAP 10 g，メタノール/クロロホルム）で精製し、標記の化合物（黄色固体，45 mg，0.074 mmol，72%）を得た。

^{1}H-NMR(400MHz，DMSO-d_6) δ[ppm]：7.83（1H，d，J = 7.1 Hz），7.12（1H，d，J = 10.5 Hz），7.05（1H，s），7.02（1H，d，J = 11.0 Hz），4.89-4.83（1H，m），3.89（3H，s），3.88（3H，s），3.86-3.75（4H，m），3.84（3H，s），3.62（3H，s），3.06（1H，dd，J = 13.9，5.1 Hz），2.39-2.31（1H，m），2.17-2.10（1H，m），2.00-1.91（1H，m），1.64-1.58（2H，m），1.51-1.45（4H，m）.

ESI-MS m/z：611（[M+H]$^+$）

[0441] 実施例３５２

OnCusp
Ex. 1038

4-ヨード-N-[(チオモルホリン-4-イル)チオカルボニル] デアセチルコルヒチンの合成

アルゴン雰囲気下、4-ヨードデアセチルコルヒチン (50 mg, 0.103 mmol) をジクロロメタン (2 mL) に溶解し、0℃に冷却した。そこへトリエチルアミン (34 μl, 0.103 × 2.4 mmol)、チオホスゲン (8 μl, 0.103 × 1.05 mmol) を加え、0℃で2時間撹拌した。そこへチオモルホリン (20 μl, 0.103 × 2 mmol) を加え、0℃で10分、次いで室温で2時間撹拌した。反応液に酢酸エチルを加え、10% クエン酸水溶液、飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄した。酢酸エチル層を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Biotage Isolera One, SNAP 10 g, メタノール/クロロホルム) で精製し、標記の化合物 (黄色固体, 48 mg, 0.076 mmol, 74%) を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 7.96 (1H, d, J = 7.1 Hz), 7.13 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.03 (1H, s), 7.03 (1H, d, J = 11.2 Hz), 4.88-4.82 (1H, m), 4.21-4.09 (4H, m), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.07 (1H, dd, J = 13.9, 5.1 Hz), 2.61-2.59 (4H, m), 2.40-2.32 (1H, m), 2.17-2.10 (1H, m), 2.05-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 629 ([M+H]$^+$)

[0442] 参考例３２

4-クロロ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチンの合成

4-クロロデアセチルコルヒチン(0.400 g, 1.02 mmol)のジクロロメタン(10 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて、チオホスゲン(93.2 μL, 1.02×1.2 mmol)およびトリエチルアミン(355 μL, 1.02×2.5 mmol)を添加して、同温度で2時間撹拌した。反応液にクロロホルムと10%硫酸水素ナトリウムを注ぎ、有機層を取った。有機層は飽和炭酸水素ナトリウム水様液、次いでブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(淡褐色固体, 0.443 g,

1.02 mmol, 定量的)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.24 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.10 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.92-4.87 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J=12.8, 6.0 Hz), 2.46-2.39 (1H, m), 2.20-2.08 (2H, m).

ESI-MS m/z: 434 $[M+H]^+$.

[0443] 実施例３５３

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチン(30 mg, 0.0691 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(2 mL)溶液に、室温で2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾール(11 mg, 0.0691×1.2 mmol)を加えて、80℃で一晩撹拌した。反応液を室温まで冷却した後、クロロホルムとブラインを加えて有機層を取った。有機層は10%硫酸水素ナトリウム、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いでブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(淡褐色固体, 18 mg, 0.0319 mmol, 46%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.54-7.41 (2H, m), 7.22-7.03 (5H, m), 4.86-4.79 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.22-3.16 (1H, m), 2.31-2.09.

ESI-MS m/z: 567 $[M+H]^+$.

[0444] 実施例３５４

N-[(ベンゾチアゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 11 mg, 0.0190 mmol, 28%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに2-アミ

ノベンゾチアゾールを用いた。また、精製は分取HPLCにて行った。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.96-7.67 (br-m), 7.44-7.39 (1H, br-m), 7.28-7.26 (1H, br-m), 7.20 (1H, d, J=10.5 Hz), 7.12-7.03 (2H, m), 4.81-4.74 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.66 (3H, s), 3.21-3.14 (1H, m), 2.27-1.98 (3H, m).

ESI-MS m/z: 584 $[M+H]^+$.

[0445] 実施例３５５

4-クロロ-N-[(ピリミジン-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 5 mg, 0.00934 mmol, 14%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに2-アミノピリミジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 11.84 (1H, d, J=6.6 Hz), 11.04 (1H, s), 8.73 (2H, d, J=4.9 Hz), 7.24 (2H, t, J=4.9 Hz), 7.20 (2H, d, J=10.5 Hz), 7.07 (1H, d, J=11.2 Hz), 6.99 (1H, s), 4.87-4.79 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.20-3.16 (1H, m), 2.30-2.09 (3H, m).

ESI-MS m/z: 529 $[M+H]^+$.

[0446] 実施例３５６

4-クロロ-N-[(ピリダジン-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 20 mg, 0.0373 mmol, 54%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに3-アミノピリダジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 12.15 (1H, d, J=6.8 Hz), 11.07 (1H, s), 8.97 (1H, d, J=4.6 Hz), 7.74 (1H, dd, J=9.0, 4.6 Hz), 7.54 (1H, d,

OnCusp
Ex. 1038

J=9.0 Hz), 7.21 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.08 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.00 (1H, s), 4.87-4.81 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.19 (1H, dd, J=12.4, 3.4 Hz), 2.35-2.19 (2H, m), 2.13-2.05 (1H, m).

ESI-MS m/z: 529 $[M+H]^+$.

[0447] 実施例３５７

4-クロロ-N-[(ピリジン-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 17 mg, 0.0326 mmol, 47%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに2-アミノピリジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 12.37 (1H, d, J=6.8 Hz), 10.85 (1H, s), 8.34-8.32 (1H, m), 7.86-7.81 (1H, m), 7.22-7.18 (2H, m), 7.14-7.11 (1H, m), 7.07 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.00 (1H, s), 4.87-4.80 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.15 (1H, m), 2.31-2.09 (3H, m).

ESI-MS m/z: 528 $[M+H]^+$.

[0448] 実施例３５８

4-クロロ-N-[(ピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(黄色固体, 26 mg, 0.0499 mmol, 72%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに3-アミノ-1H-ピラゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 12.64 (1H, s), 10.66 (1H, s), 10.39 (1H, br-s), 7.73 (1H, t, J=2.0 Hz), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.98 (1H, s), 5.96 (1H, s), 4.88-4.81 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.19-3.14 (1H, m), 2

.30-2.16 (2H, m), 2.00-1.90 (1H, m).

ESI-MS m/z: 517 $[M+H]^+$.

[0449] 実施例３５９

4-クロロ-N-[(1-メチルピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(黄色固体, 32 mg, 0.0598 mmol, 96%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに3-アミノ-1-メチル-1H-ピラゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.61 (1H, s), 10.20 (1H, br-s), 7.66 (1H, d, J=2.2 Hz), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.98 (1H, s), 5.92 (1H, s), 4.83-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.82 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.19-3.14 (1H, m), 2.29-2.16 (2H, m), 2.05-1.98 (1H, m).

ESI-MS m/z: 531 $[M+H]^+$.

[0450] 実施例３６０

4-クロロ-N-[(4-メチルチアゾール-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(黄色固体, 25 mg, 0.0455 mmol, 66%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに2-アミノ-4-メチルチアゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.18 (1H, d, J=10.5 Hz), 7.08-7.00 (2H, m), 6.69 (1H, br-s), 4.76-4.69 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.19-3.13 (1H, m), 2.27-2.00 (3H, m), 2.24 (3H, br-s).

ESI-MS m/z: 548 $[M+H]^+$.

[0451] 実施例３６１

4-クロロ-N-[(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)チオカルバモイル]デアセチ

ルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(黄色固体, 6 mg, 0.0106 mmol, 15%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、2-アミノ-4,5-ジメチルチアゾール塩酸塩およびトリエチルアミンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.08-6.99 (2H, m), 4.78-4.70 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.18-3.11 (1H, m), 2.25-1.96 (9H, m).

ESI-MS m/z: 562 $[M+H]^+$.

[0452] 実施例３６２

4-クロロ-N-[(ピリジン-4-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 25 mg, 0.0479 mmol, 63%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、4-アミノピリジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.07 (1H, s), 8.89 (1H, d, J=6.8 Hz), 8.37 (2H, d, J=5.6 Hz), 7.59 (2H, d, J=5.6 Hz), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.76-4.69 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.18-3.13 (1H, m), 2.22-2.12 (2H, m), 2.06-1.97 (1H, m).

ESI-MS m/z: 528 $[M+H]^+$.

[0453] 実施例３６３

4-クロロ-N-[3-(2-ヒドロキシエトキシ)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

3-(2-ヒドロキシエトキシ)安息香酸(34 mg, 0.153×1.2 mmol)のジクロロメタン(4 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にて1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(36 mg, 0153×1.2 mmol)、1-ヒ

ドロキシベンゾトリアゾール一水和物(28 mg, 0.153×1.2mmol)を加えて30分間撹拌した。そこに、4-クロロデアセチルコルヒチン(60 mg, 0.153 mmol)を加えて室温で一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(淡黄色固体, 72 mg, 0.130 mmol, 85%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.05 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.47-7.43 (2H, m), 7.39 (1H, t, J=7.8 Hz), 7.20 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.14-7.11 (1H, m), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.88 (1H, t, J=5.3 Hz), 4.51-4.45 (1H, m), 4.03 (2H, t, J=5.3 Hz), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.73 (2H, q, J=5.3 Hz), 3.60 (3H, s), 3.19-3.13 (1H, m), 2.21-2.02 (3H, m).

ESI-MS m/z: 556 $[M+H]^+$.

[0454] 実施例３６４

4-クロロ-N-[3-(2-ヒドロキシエトキシ)-4-メトキシベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-N-[3-(2-ヒドロキシエトキシ)ベンゾイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 64 mg, 0.109 mmol, 71%)を得た。3-(2-ヒドロキシエトキシ)安息香酸の代わりに、3-(2-ヒドロキシエトキシ)-4-メトキシ安息香酸を用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.90 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.57 (1H, dd, J=8.3, 2.0 Hz), 7.45 (1H, d, J=2.0 Hz), 7.20 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.5 Hz), 7.05 (2H, d, J=10.5 Hz), 7.05 (2H, d, J=8.3 Hz), 4.87 (1H, t, J=5.3 Hz), 4.52-4.44 (1H, m), 4.01 (2H, t, J=5.3 Hz), 3.93 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.82 (2H, s), 3.72 (2H, q, J=5.3 Hz), 3.60 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J=12.2, 5.4 Hz), 2.22-2.02 (3H, m).

ESI-MS m/z: 586 $[M+H]^+$.

[0455] 実施例３６５

4-クロロ-N-[(ピラジン-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの

合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 14 mg, 0.0261 mmol, 38%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、2-アミノピラジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 11.51 (1H, d, J=6.8 Hz), 11.18 (1H, s), 8.59 (1H, d, J=1.2 Hz), 8.34 (1H, dd, J=2.7, 1.2 Hz), 8.32 (1H, d, J=2.7 Hz), 7.20 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.07 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.00 (1H, s), 4.84-4.78 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.15 (1H, m), 2.30-2.12 (3H, m).

ESI-MS m/z: 529 $[M+H]^+$.

[0456] 実施例３６６

4-クロロ-N-[(1,3,4-チアジアゾール-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 10 mg, 0.0187 mmol, 27%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、2-アミノ-1,3,4-チアジアゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.20-7.02 (3H, m), 4.76-4.65 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.64 (3H, s), 3.18-3.10 (2H, m), 2.25-1.98.

ESI-MS m/z: 535 $[M+H]^+$.

[0457] 実施例３６７

4-クロロ-N-[(ピリミジン-5-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 18 mg, 0.0336 mmol, 49%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、5-ア

ミノピリミジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.83 (1H, s), 8.89 (1H, d, J=7.1 Hz), 8.88 (1H, s), 8.87 (2H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.13 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.81-4.74 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.61 (3H, s), 3.20-3.11 (1H, m), 2.23-2.11 (2H, m), 2.05-1.98 (1H, m).

ESI-MS m/z: 529 $[M+H]^+$.

[0458] 参考例３３

2-(3-ニトロフェノキシ)エタノールの合成

3-ニトロフェノール(0.500 g, 3.59 mmol)のアセトン(20 mL)溶液に、室温、アルゴンガス雰囲気下にて、炭酸カリウム(0.496 g, 3.59 mmol)および2-ブロモエタノール(509 μL, 3.59×2 mmol)を加えて6時間煮沸還流した。反応液を室温まで冷却した後、クロロホルムおよび水を加えた。有機層を取り、0.1 mol/L水酸化ナトリウム次いでブラインで洗浄後、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(0.213 g, 1.16 mmol, 32%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.83-7.80 (1H, m), 7.72 (1H, t, J=2.5 Hz), 7.58 (1H, t, J=8.3 Hz), 7.43 (1H, dd, J=8.3, 2.5 Hz), 4.94 (1H, t, J=5.0 Hz), 4.12 (2H, t, J=5.0 Hz), 3.74 (2H, q, J=5.0 Hz).

[0459] 参考例３４

2-(3-アミノフェノキシ)エタノールの合成

2-(3-ニトロフェノキシ)エタノール(0.186 g, 1.02 mmol)の1,4-ジオキサン(10 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて10%パラジウム-炭素(30 mg)を添加した後、反応容器内を水素ガスで置換した。反応液を室温、水素ガス雰囲気下(風船)にて7時間激しく撹拌した。不溶物をろ去、1,4-ジオキサンで洗いこんだ後、ろ液と洗浄液を合わせて濃縮乾固して、標記の化合物(褐色タール状物, 0.149 g, 0.970 mmol, 96%)の物は精製せずに次工程に使用した

。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 6.87 (1H, t, J=8.3 Hz), 6.14-6.11 (2H, m), 6.08-6.05 (1H, m), 5.00 (2H, br-s), 4.78 (1H, t, J=5.3 Hz), 3.85 (2H, t, J=5.3 Hz), 3.66 (2H, q, J=5.3 Hz).

ESI-MS m/z: 154 $[M+H]^+$.

[0460] 参考例３５

2-(4-アミノフェノキシ)エタノールの合成

2-(3-アミノフェノキシ)エタノールの合成の合成と同様の方法にて、標記の化合物(暗褐色固体, 0.250 g, 1.64 mmol, 定量的)を得た。2-(3-ニトロフェノキシ)エタノールの代わりに、2-(4-ニトロフェノキシ)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 6.64 (2H, d, J=8.8 Hz), 6.49 (2H, d, J=8.8 Hz), 4.76 (1H, t, J=5.3 Hz), 4.58 (2H, br-s), 3.82 (2H, t, J=5.3 Hz), 3.64 (2H, q, J=5.3 Hz).

ESI-MS m/z: 154 $[M+H]^+$.

[0461] 実施例３６８

4-クロロ-N-[3-(2-ヒドロキシエトキシ)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 35 mg, 0.0590 mmol, 85%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、2-(3-アミノフェノキシ)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.72 (1H, s), 8.44 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.24-7.15 (3H, m), 7.12 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=11.0 Hz), 6.92 (1H, d, J=7.8 Hz), 6.66 (1H, dd, J=8.2, 2.1 Hz), 4.85 (1H, t, J=5.6 Hz), 4.82-4.75 (1H, m), 3.95-3.91 (2H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.71-3.67 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.19-3.09 (1H, m), 2.18-1.98 (3H, m).

ESI-MS m/z: 587 $[M+H]^+$.

[0462] 実施例３６９

4-クロロ-N-[4-(2-ヒドロキシエトキシ)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 24 mg, 0.0404 mmol, 59%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、2-(4-アミノフェノキシ)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.51 (1H, s), 8.22 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.27 (2H, d, J=8.0 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.88 (2H, d, J=8.0 Hz), 4.86 (1H, t, J=5.0 Hz), 4.83-4.76 (1H, m), 3.95 (2H, t, J=5.0 Hz), 3.91 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.69 (2H, q, J=5.0 Hz), 3.61 (3H, s), 3.17-3.08 (1H, m), 2.16-1.97 (3H, m).

ESI-MS m/z: 587 $[M+H]^+$.

[0463] 参考例３６

5-アミノ-1,2-ジメチルイミダゾールの合成

1,2-ジメチル-5-ニトロイミダゾール(0.300 g, 2.13 mmol)の1,4-ジオキサン(5 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて10%パラジウム-炭素(60 mg)を添加した後、反応液を室温、水素ガス雰囲気下(風船)にて一晩撹拌した。不溶物をセライトパッドにてろ去、1,4-ジオキサンで洗いこんだ。ろ液と洗浄液は合わせて減圧下、3mL程度まで濃縮した。残渣物にn-ヘキサンを加えて析出物をろ取した。ろ取物はn-ヘキサンで洗浄、次いで減圧乾燥して、標記の化合物(黄土色固体, 0.180 g, 1.62 mmol, 76%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 5.89 (1H, s), 4.20 (2H, s), 3.24 (3H, s), 2.13 (3H, s).

[0464] 参考例３７

5-アミノ-2-メチルイミダゾール-1-エタノールの合成

2-メチル-5-ニトロイミダゾール-1-エタノール(0.300 g, 1.75 mmol)の1,4

OnCusp
Ex. 1038

-ジオキサン(30 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて10%パラジウム-炭素(200 mg)を添加した後、反応液を室温、水素ガス雰囲気下(風船)にて6時間撹拌した。不溶物をセライトパッドにてろ去、1,4-ジオキサンで洗いこんだ。ろ液と洗浄液は合わせて減圧下、10 mL程度まで濃縮した。残渣物にn-ヘキサンを加えて析出物をろ取した。ろ取物はn-ヘキサンで洗浄、次いで減圧乾燥して、標記の化合物(黄橙色固体, 0.156 g, 1.11 mmol, 63%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 5.91 (1H, s), 4.97 (1H,. br-s), 4.13 (2H, br-s), 3.75 (2H, t, J=5.7 Hz), 3.55 (2H, br-s), 2.16 (3H, s).

[0465] 実施例３７０

4-クロロ-N-[(1,2-ジメチルイミダゾール-5-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 12 mg, 0.0218 mmol, 32%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、5-アミノ-1,2-ジメチルイミダゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.11 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05-7.00 (4H, m), 4.99-4.92 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.32 (3H, s), 3.14 (1H, dd, J=13.3, 5.0 Hz), 2.45-2.37 (1H, m), 2.27 (3H, s), 2.21-2.10 (1H, m), 2.06-1.96 (1H, m).

ESI-MS m/z: 545 $[M+H]^+$.

[0466] 実施例３７１

4-クロロ-N-{[1-(2-ヒドロキシエチル)-2-メチルイミダゾール-5-イル]チオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 11 mg, 0.0190 mmol, 28%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、5-アミノ-2-メチルイミダゾール-1-エタノールを用いた。

OnCusp
Ex. 1038

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.11 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.15 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.04-6.99 (3H, m), 5.06 (1H, t, J=5.1 Hz), 5.00-4.93 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.86-3.82 (2H, m), 3.65 (3H, s), 3.62-3.57 (2H, m), 3.14 (1H, dd, J=13.3, 5.5 Hz), 2.46-2.37 (1H, m), 2.30 (3H, s), 2.21-2.12 (1H, m), 2.05-1.96 (1H, m).

ESI-MS m/z: 575 $[M+H]^+$.

[0467] 参考例３８

2-(5-ニトロ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノールおよび2-(3-ニトロ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノールの合成

3-ニトロ-1H-ピラゾール(0.300 g, 2.65 mmol)のアセトニトリル(15 mL)溶液に、炭酸カリウム(0.549 g, 2.65×1.5 mmol)、臭化テトラ-m-ブチルアンモニウム(43 mg, 2.65×0.5 mmol)および2-ブロモエタノール(376 μL, 2.65×2.0 mmol)を添加して、アルゴンガス雰囲気下にて、2時間煮沸還流した。反応液を室温まで放冷した後、クロロホルムとブラインを加えた。有機層を取り、水層はさらにクロロホルム(×2)にて抽出した。有機層は合わせて無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、2-(5-ニトロ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノール(褐色タール状物, 69 mg, 0.439 mmol, 17%)および2-(3-ニトロ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノール(褐色タール状物, 0.267 g, 1.70 mmol, 64%)を得た。

2-(5-ニトロ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノール

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.70 (1H, d, J=2.2 Hz), 7.24 (1H, d, J=2.2 Hz), 4.94 (1H, t, J=5.7 Hz), 4.61 (2H, t, J=5.7 Hz), 3.71 (2H, q, J=5.7 Hz).

ESI-MS m/z: 158 $[M+H]^+$.

2-(3-ニトロ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノール

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.99 (1H, d, J=2.4 Hz), 7.03 (1H, d, J

=2.4 Hz), 4.99 (1H, t, J=5.4 Hz), 4.27 (2H, t, J=5.4 Hz), 3.78 (2H, q, J=5.4 Hz).

ESI-MS m/z: 158 $[M+H]^+$.

[0468] 参考例３９

2-(5-アミノ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノールの合成

2-(5-ニトロ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノール(69 mg, 0.439 mmol)のエタノール(2 mL)溶液に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて10%パラジウム-炭素(10 mg)を添加した後、反応液を室温、水素ガス雰囲気下(風船)にて一晩撹拌した。不溶物をセライトパッドにてろ去、エタノールで洗いこんだ。ろ液と洗浄液は合わせて減圧下、濃縮乾固して、標記の化合物(白色固体, 52 mg, 0.408 mmol, 93%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.02 (1H, d, J=1.7 Hz), 5.26 (1H, d, J=1.7 Hz), 5.04 (2H, br-s), 4.90 (1H, t, J=5.7 Hz), 3.89 (2H, t, J=5.7 Hz), 3.64 (2H, q, J=5.7 Hz).

ESI-MS m/z: 128 $[M+H]^+$.

[0469] 参考例４０

2-(3-アミノ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノールの合成

2-(3-ニトロ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノール(0.187 g, 1.19 mmol)のエタノール(6 mL)溶液に氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて10%パラジウム-炭素(20 mg)を添加した後、反応液を室温、水素ガス雰囲気下(風船)にて一晩撹拌した。不溶物をセライトパッドにてろ去、エタノールで洗いこんだ。ろ液と洗浄液は合わせて減圧下、濃縮乾固して、標記の化合物(淡褐色タール状物, 0.151 g, 1.18 mmol, 99%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.26 (1H, d, J=2.0 Hz), 5.34 (1H, d, J=2.0 Hz), 4.75 (1H, t, J=5.7 Hz), 4.48 (2H, br-s), 3.84 (2H, t, J=5.7 Hz), 3.63 (2H, q, J=5.7 Hz).

ESI-MS m/z: 128 $[M+H]^+$.

[0470] 実施例３７２

4-クロロ-N-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピラゾール-5-イル]チオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡桃褐色固体, 25 mg, 0.0443 mmol, 64%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、2-(5-アミノ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 9.28 (1H, s), 8.65 (1H, d, J=5.6 Hz), 7.39 (1H, d, J=1.7 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.5 Hz), 7.09 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.5 Hz), 6.15 (1H, d, J=1.7 Hz), 4.96 (1H, t, J=5.1 Hz), 4.80-4.73 (1H, m), 3.95 (2H, t, J=5.9 Hz), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.70 (2H, q, J=5.9 Hz), 3.59 (3H, s), 3.16-3.10 (1H, m), 2.15-1.98 (3H, m).

ESI-MS m/z: 561 $[M+H]^+$.

[0471] 実施例３７３

4-クロロ-N-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピラゾール-3-イル]チオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

N-[(ベンゾイミダゾール-2-イル)チオカルバモイル]-4-クロロデアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡褐色固体, 33 mg, 0.0585 mmol, 85%)を得た。2-アミノ-1H-ベンゾイミダゾールの代わりに、2-(3-アミノ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ [ppm]: 10.65 (1H, s), 10.33 (1H, br-s), 7.68 (1H, d, J=2.4 Hz), 7.19 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.00 (1H, s), 5.91 (1H, s), 4.91 (1H, t, J=5.4 Hz), 4.83-4.76 (1H, m), 4.11 (2H, t, J=5.4 Hz), 3.93 (3H, s), 3.90 (6H, s), 3.75 (2H, q, J=5.4 Hz), 3.63 (3H, s), 3.19-3.14 (1H, m), 2.26-2.18 (2H, m), 2.04-1.97 (1H, m).

ESI-MS m/z: 561 $[M+H]^+$.

[0472] 参考例４１

4-ブロモ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチンの合成

4-ブロモデアセチルコルヒチン(1.00 g, 2.29 mmol)のジクロロメタン(11 mL)溶液に、氷冷、アルゴンガス雰囲気下にて、チオホスゲン(192 μL, 2.29×1.1 mmol)およびトリエチルアミン(734 μL, 2.29×2.3 mmol)を添加して、徐々に室温に戻しながら一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(淡褐色固体, 1.04 g, 2.17 mmol, 95%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.24 (1H, s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.10 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.89 (1H, dd, J=10.9, 6.5 Hz), 3.92 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.11 (1H, dd, J=13.3, 5.7 Hz), 2.47-2.37 (1H, m), 2.29-2.20 (1H, m), 2.14-2.06 (1H, m).

ESI-MS m/z: 478 $[M+H]^+$, 480 $[M+2+H]^+$.

[0473] 実施例３７４

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチン(30 mg, 0.0627 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(1 mL)溶液に、室温で3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾール (7 mg, 0.0627×1.2 mmol)を加えて、80℃で一晩撹拌した。反応液を室温まで冷却した後、クロロホルムとブラインを加えて有機層を取った。有機層は10%硫酸水素ナトリウム、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、次いでブラインにて洗浄、無水硫酸ナトリウムにて乾燥、ろ過、減圧下濃縮乾固した。残渣物をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 16 mg, 0.0279 mmol, 44%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 13.61 [1H, s], 11.03 (1H, s), 10.50 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.94 (1H, s), 4.82-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.20-3.14 (1H, m), 2.38 (3H, s), 2.34-2.20 (2H, m),

2.01-1.93 (1H, m).

ESI-MS m/z: 576 $[M+H]^+$, 578]M+2+H]$^+$.

[0474] 実施例３７５

4-ブロモ-N-[(1-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体,18 mg, 0.0314 mmol, 50%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-アミノ-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 11.18 (1H, s), 10.42 (1H, d, J=6.8 Hz), 8.50 (1H, s), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.95 (1H, s), 4.83-4.76 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.84 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.20-3.14 (1H, m), 2.34-2.17 (2H, m), 2.05-1.96 (1H, m).

ESI-MS m/z: 576 $[M+H]^+$., 578 $[M+2+H]^+$.

[0475] 実施例３７６

4-ブロモ-N-[(1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 18 mg, 0.0314 mmol, 50%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-アミノ-1,2,4-トリアゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.48 (1H, d, J=7.6 Hz), 8.11 (2H, s), 7.73 (1H, s), 7.19 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.07 (1H, s), 7.06 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.84-4.74 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.65 (3H, s), 3.20-3.14 (1H, m), 2.30-2.21 (1H, m), 2.10-2.01 (1H, m).

ESI-MS m/z: 562 $[M+H]^+$, 564 $[M+2+H]^+$.

OnCusp
Ex. 1038

[0476] 実施例３７７

4-ブロモ-N-[(4-シアノピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 22 mg, 0.0372 mmol, 59%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-アミノ-4-ピラゾールカルボニトリルを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 13.59 (1H, s), 10.42 (1H, s), 9.30 (1H, d, J=5.9 Hz), 8.57 (1H, s), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (1H, s), 4.81-4.74 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.15 (1H, dd, J=12.8, 4.0 Hz), 2.29-2.10 (2H, m), 2.03-1.94 (1H, m).

ESI-MS m/z: 586 $[M+H]^+$, 588 $[M+2+H]^+$.

[0477] 実施例３７８

4-ブロモ-N-[(5-メチルピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(黄色固体, 34 mg, 0.0592 mmol, 94%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-アミノ-5-メチルピラゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 12.34 (1H, s), 10.57 (1H, s), 10.45 (1H, br-s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.97 (1H, s), 5.73 (1H, s), 4.86-4.79 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.20-3.14 (1H, m), 2.34-2.17 (2H, m), 2.22 (3H, s), 1.95-1.87 (1H, m).

ESI-MS m/z: 575 $[M+H]^+$, 577 $[M+2+H]^+$.

[0478] 実施例３７９

4-ブロモ-N-[(1-メチルピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコ

OnCusp
Ex. 1038

ルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 32 mg, 0.0557 mmol, 89%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-アミノ-1-メチルピラゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.63 (1H, s), 10.22 (1H, br-s), 7.67 (1H, d, J=2.3 Hz), 7.18 (1H, d, J=10.9 Hz), 7.06 (1H, d, J=10.9 Hz), 6.98 (1H, s), 5.91 (1H, s), 4.79-4.74 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.16 (1H, m), 2.33-2.19 (2H, m), 2.04-1.97 (1H, m).

ESI-MS m/z: 575 $[M+H]^+$, 577 $[M+2+H]^+$.

[0479] 実施例３８０

4-ブロモ-N-[(ピラゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 25 mg, 0.0448 mmol, 71%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-アミノピラゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.67 (1H, s), 10.40 (1H, br-s), 7.74 (1H, d, J=1.7 Hz), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.98 (1H, s), 5.96 (1H, s), 4.86-4.80 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.15 (1H, m), 2.33-2.19 (2H, m), 1.96-1.89 (1H, m).

ESI-MS m/z: 561 $[M+H]^+$, 563 $[M+2+H]^+$.

[0480] 実施例３８１

4-ブロモ-N-[(3,4-ジメチルイソオキサゾール-5-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デ

アセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 22 mg, 0.0373 mmol, 59%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、5-アミノ-3,4-ジメチルイソキサゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.88 (1H, s), 8.81 (1H, d, J=7.4 Hz), 7.15 (1H, d, J=11.2 Hz), 7.10 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=11.2 Hz), 4.75-4.70 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.16-3.11 (1H, m), 2.26-2.18 (1H, m), 2.13 (3H, s), 2.09-2.03 (2H, m), 1.73 (3H, s).

ESI-MS m/z: 590 $[M+H]^+$, 592 $[M+2+H]^+$.

[0481] 実施例３８２

4-ブロモ-N-[(5-メチルイソオキサゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 26 mg, 0.0453 mmol, 72%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-アミノ-5-メチルイソキサゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.21 (1H, br-s), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.13 (1H, s), 7.05 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.26-4.12 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.54 (3H, s), 3.18-3.13 (1H, m), 2.29-2.17 (2H, m), 1.95-1.84 (1H, m), 1.93 (3H, s).

ESI-MS m/z: 576 $[M+H]^+$, 578 $[M+2+H]^+$.

[0482] 実施例３８３

4-ブロモ-N-[(4-メチルチアゾール-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 29 mg, 0.0491 mmol, 78%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-アミノ-4-メチルチアゾールを用いた。

OnCusp
Ex. 1038

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.18 (1H, d, J=11.0 Hz), 7.08-7.01 (2H, m), 4.73-4.66 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.19-3.13 (1H, m), 2.31-1.98 (3H, m), 2.24 (3H, s).

ESI-MS m/z: 592 $[M+H]^+$, 594 $[M+2+H]^+$.

[0483] 実施例３８４

4-ブロモ-N-[(チアゾール-2-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 32 mg, 0.0557 mmol, 89%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-アミノチアゾールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.44 (1H, br-s), 7.18 (1H, d, J=10.5 Hz), 7.10-7.00 (3H, m), 4.74-4.65 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.19-3.13 (1H, m), 2.32-1.97 (3H, m).

ESI-MS m/z: 578 $[M+H]^+$, 580 $[M+2+H]^+$.

[0484] 実施例３８５

4-ブロモ-N-[3-(2-ヒドロキシエチル)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 34 mg, 0.0533 mmol, 85%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-(3-アミノフェニル)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.69 (1H, s), 8.37 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.31-7.25 (2H, m), 7.20 (1H, t, J=7.5 Hz), 7.16 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.95 (1H, d, J=7.5 Hz), 4.81-4.74 (1H, m), 4.61 (1H, br-s), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.62 (3H, s), 3.58 (2H, t, J=7.1 Hz), 3.18-3.12 (1H, m), 2.68 (2H, t, J=7.1 Hz), 2.29-2.08 (2H, m), 2.04-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 615 $[M+H]^+$, 617 $[M+2+H]^+$.

[0485] 実施例３８６

4-ブロモ-N-[(ピリダジン-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 20 mg, 0.0348 mmol, 56%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-アミノピリダジンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 12.15 (1H, d, J=6.8 Hz), 11.07 (1H, s), 8.97 (1H, dd, J=4.6, 0.8 Hz), 7.74 (1H, dd, J=8.9, 4.6 Hz), 7.54 (1H, dd, J=8.9, 0.8 Hz), 7.20 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.08 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.00 (1H, s), 4.85-4.79 (1H, m), 3.93 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.64 (3H, s), 3.22-3.17 (1H, m), 2.37-2.24 (2H, m), 2.11-2.03 (1H, m).

ESI-MS m/z: 573 $[M+H]^+$, 575 $[M+2+H]^+$.

[0486] 実施例３８７

N-[(アゼチジン-1-イル)チオカルボニル]-4-ブロモデアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチン(30 mg, 0.0627 mmol)のジクロロメタン(2 mL)溶液に、室温でアゼチジン(5.1 μL, 0.0627×1.2 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(乳白色固体, 30 mg, 0.0553 mmol, 88%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.85 (1H, d, J=7.6 Hz), 7.13 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.07 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.78-4.71 (1H, m), 4.13-3.91 (4H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=13.4, 5.4 Hz), 2.24-2.05 (4H, m), 2.00-1.90 (1H, m).

ESI-MS m/z: 535[M+H]+, 537 [M+2+H]+.

[0487] 実施例３８８

4-ブロモ-N-(メチルチオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチン(30 mg, 0.0627 mmol)のジクロロメタン(2 mL)溶液に、室温でメチルアミン塩酸塩(5 mg, 0.0627×1.2 mmol)およびトリエチルアミン(13.1 μL, 0.0627×1.5 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(淡黄色固体, 28 mg, 0.0549 mmol, 88%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.10 (1H, br-s), 7.44 (1H, br-s), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.82-4.70 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.15-3.09 (1H, m), 2.82 (3H, d, J=4.6 Hz), 2.25-1.84 (3H, m).

ESI-MS m/z: 509[M+H]+, 511 [M+2+H]+.

[0488] 実施例３８９

4-ブロモ-N-(チオカルバモイル)デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチン(30 mg, 0.0627 mmol)の1,4-ジオキサン(1 mL)溶液に、室温でアンモニア(0.5 mol/L in 1,4-ジオキサン, 301 μL, 0.0627×2.4 mmol)を加えて、室温で一晩撹拌した。反応液をフラッシュクロマトグラフ法(装置:Biotage社Isolera One, クロロホルム/メタノール)にて精製し、標記の化合物(白色固体, 23 mg, 0.0465 mmol, 74%)を得た。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.30 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.13 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.05 (2H, s), 7.03 (2H, d, J=10.7 Hz), 4.68-4.61 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.59 (3H, s), 3.12 (1H, dd, J=13.5, 5.0 Hz), 2.26-2.17 (1H, m), 2.09-2.00 (1H, m), 1.88-1.79 (1H, m).

ESI-MS m/z: 495 [M+H]+, 497 [M+2+H]+.

[0489] 実施例３９０

4-ブロモ-N-{[1-(2-ヒドロキシエチル)-1,2,4-トリアゾール-3-イル]チオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(白色固体, 26 mg, 0.0429 mmol, 68%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-(3-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 11.18 (1H, s), 10.48 (1H, d, J=6.8 Hz), 8.50 (1H, s), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.97 (1H, s), 5.01 (1H, br-s), 4.84-4.77 (1H, m), 4.18 (2H, t, J=5.1 Hz), 3.92 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.74 (2H, t, J=5.1 Hz), 3.63 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J=12.3, 4.5 Hz), 2.33-2.17 (2H, m), 2.04-1.96 (1H, m).

ESI-MS m/z: 606 $[M+H]^+$, 608 $[M+2+H]^+$.

[0490] 実施例３９１

4-ブロモ-N-{[1-(2-ヒドロキシエチル)ピラゾール-3-イル]チオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(淡黄色固体, 32 mg, 0.0528 mmol, 84%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-(3-アミノ-1H-ピラゾール-1-イル)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.64 (1H, s), 10.32 (1H, s), 7.68 (1H, d, J=2.2 Hz), 7.18 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.00 (1H, s), 5.91 (1H, s), 4.91 (1H, t, J=5.2 Hz), 4.80-4.74 (1H, m), 4.11 (2H, t, J=5.5 Hz), 3.92 (3H, s), 3.90 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.75 (2H, dd, J=10.2, 5.1 Hz), 3.63 (3H, s), 3.17 (1H, dd, J=12.7, 4.1 Hz), 2.34-2.17 (2H, m), 2.03-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 605 $[M+H]^+$, 607 $[M+2+H]^+$.

[0491] 実施例３９２

4-ブロモ-N-[4-(2-ヒドロキシエトキシ)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 30 mg, 0.0470 mmol, 75%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-(4-アミノフェノキシ)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.50 (1H, s), 8.20 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.27 (2H, d, J=9.0 Hz), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.03 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.88 (2H, d, J=9.0 Hz), 4.84 (1H, t, J=5.0 Hz), 4.82-4.75 (1H, m), 3.95 (2H, t, J=5.0 Hz), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.69 (2H, q, J=5.0 Hz), 3.61 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J=12.8, 5.2 Hz), 2.26-2.17 (1H, m), 2.14-2.04 (1H, m), 2.02-1.94 (1H, m).

ESI-MS m/z: 631 $[M+H]^+$, 633 $[M+2+H]^+$.

[0492] 実施例３９３

4-ブロモ-N-[3-(2-ヒドロキシエトキシ)フェニルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 31 mg, 0.0473 mmol, 76%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-(3-アミノフェノキシ)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 9.71 (1H, s), 8.43 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.24 (1H, t, J=2.0 Hz), 7.19 (2H, t, J=8.0 Hz), 7.16 (2H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 6.92 (1H, d, J=8.0 Hz), 6.66 (1H, dd, J=8.0, 2.0 Hz), 4.84 (1H, br-s), 4.80-4.74 (1H, m), 3.93 (2H, t, J=4.4 Hz), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.88 (3H, s), 3.69 (2H, t, J=4.4 Hz), 3.62 (3H, s), 3.14 (1H, dd, J=12.9, 5.1 Hz), 2.28-2.0

8 (2H, m), 2.04-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 631 $[M+H]^+$, 633 $[M+2+H]^+$.

[0493] 実施例３９４

4-ブロモ-N-[(4-シアノフェニル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(白色固体, 26 mg, 0.0441 mmol, 70%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、4-シアノアニリンを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 10.12 (1H, s), 8.81 (1H, d, J=6.8 Hz), 7.75 (2H, d, J=9.5 Hz), 7.72 (2H, d, J=9.5 Hz), 7.17 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.11 (1H, s), 7.04 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.76-4.69 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.19-3.13 (1H, m), 2.30-2.12 (2H, m), 2.03-1.94 (1H, m).

ESI-MS m/z: 596 $[M+H]^+$, 598 $[M+2+H]^+$.

[0494] 実施例３９５

4-ブロモ-N-[(2-ヒドロキシエチル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 19 mg, 0.0350 mmol, 56%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-アミノエタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 8.18 (1H, d, J=5.4 Hz), 7.59 (1H, br-s), 7.14 (1H, d, J=10.5 Hz), 7.05 (2H, s), 7.03 (2H, d, J=10.5 Hz), 4.81 (1H, br-s), 4.77-4.70 (1H, m), 3.91 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.60 (3H, s), 3.50-3.35 (4H, m), 3.12 (1H, dd, J=13.5, 4.5 Hz), 2.26-2.16 (1H, m), 2.11-2.01 (1H, m), 1.88-1.77 (1H, m).

ESI-MS m/z: 539 $[M+H]^+$, 541 $[M+2+H]^+$.

[0495] 実施例３９６

4-ブロモ-N-[N'-(2-ヒドロキシエチル)-N'-メチルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 35 mg, 0.0627 mmol, 定量的)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、2-(メチルアミノ)エタノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.74 (1H, d, J=6.6 Hz), 7.14 (1H, d, J=10.8 Hz), 7.08 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.8 Hz), 4.96 (1H, s), 4.87-4.81 (1H, m), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.84-3.76 (1H, m), 3.72-3.65 (1H, m), 3.62 (3H, s), 3.59-3.55 (2H, m), 3.21 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J=12.8, 5.7 Hz), 2.25-2.10 (2H, m), 2.05-1.95 (1H, m).

ESI-MS m/z: 553 $[M+H]^+$, 555 $[M+2+H]^+$.

[0496] 実施例３９７

4-ブロモ-N-[N'-(3-ヒドロキシプロピル)-N'-メチルチオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-ブロモ-N-[(5-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成と同様の方法にて、標記の化合物(乳白色固体, 33 mg, 0.0575 mmol, 92%)を得た。3-アミノ-5-メチル-1,2,4-トリアゾールの代わりに、3-(メチルアミノ)プロパノールを用いた。

^{1}H-NMR(400MHz, DMSO-d_6) δ[ppm]: 7.66 (1H, d, J=7.1 Hz), 7.14 (1H, d, J=10.7 Hz), 7.06 (1H, s), 7.02 (1H, d, J=10.7 Hz), 4.88-4.81 (1H, m), 4.63 (1H, br-s), 3.90 (3H, s), 3.89 (3H, s), 3.86 (3H, s), 3.77-3.68 (2H, m), 3.62 (3H, s), 3.41-3.36 (2H, m), 3.15 (3H, s), 3.13 (1H, dd, J=12.4, 5.4 Hz), 2.25-2.12 (2H, m), 2.06-1.96 (1H, m), 1.72-1.65 (2H, m).

ESI-MS m/z: 567 $[M+H]^+$, 569 $[M+2+H]^+$.

[0497] 参考例４２

1-メチル-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾールの合成

3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(1.018 g, 8.93 mmol)をメタノール(20 mL)に溶解し、そこへナトリウムメトキシド(1.446 g, 8.93×3 mmol)、ヨウ化メチル(1.67 mL, 8.93×3 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去し、クロロホルムに溶解した。飽和食塩水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 50 g, クロロホルム/酢酸エチル)で精製し、標記の化合物(白色固体, 434 mg, 37.9%)を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 8.17 (1H, s), 4.09 (3H, s).

ESI-MS m/z: 129 $[M+H]^+$.

[0498] 参考例４３

3-アミノ-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾールの合成

1-メチル-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール(97 mg, 0.76 mmol)をエタノール(5.0 mL)に溶解した。そこへ10%パラジウム-炭素(10 mg)を加えた。水素雰囲気下、室温で3時間攪拌した。反応後、セライトろ過した。溶媒を留去し、標記の化合物(黄色固体, 69 mg, 92.5%)を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.63 (1H, s), 4.18 (2H, br s), 3.73 (3H, s).

ESI-MS m/z: 99 $[M+H]^+$.

[0499] 実施例３９８

4-クロロ-N-[(1-メチル-1,2,4-トリアゾール-3-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチン(54 mg, 0.12 mmol)をDMF(1 mL)に溶解した。そこへ3-アミノ-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール(15 mg, 0.12×1.2 mmol)を加えて80℃で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムを加えて飽和重曹水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標

記の化合物(黄色固体, 42 mg, 65.8%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 11.17 (1H, s), 10.42 (1H, d, J = 6.6 Hz), 8.50 (1H, s), 7.19 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.95 (1H, s), 4.85-4.79 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.85 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.17-3.15 (1H, m), 2.26-2.19 (2H, m), 2.05-2.00 (1H, m).

ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$.

[0500] 参考例４４

1-メチル-5-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾールの合成

3-ニトロ1,2,4-トリアゾール(573mg, 5.02mmol)をメタノール(11 mL)に溶解し、そこへナトリウムメトキシド(407 mg, 5.02×1.5 mmol)、ヨウ化メチル(0.375 mL, 5.02×1.2 mmol)を加えて室温で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去し、クロロホルムに溶解した。飽和食塩水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/酢酸エチル)で精製し、標記の化合物(白色固体, 21 mg, 3.3%)を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.94 (1H, s), 4.31 (3H, s).

ESI-MS m/z: 129 $[M+H]^+$.

[0501] 参考例４５

5-アミノ-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾールの合成

1-メチル-5-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール(40 mg, 0.31 mmol)をエタノール(2.0 mL)に溶解した。そこへ10%パラジウム-炭素(4 mg)を加えた。水素雰囲気下、室温で3.5時間攪拌した。反応後、セライトろ過した。溶媒を留去し、標記の化合物(黄色固体, 26 mg, 85.5%)を得た。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 7.47 (1H, s), 4.39 (2H, br s), 3.64 (3H, s).

ESI-MS m/z: 99 $[M+H]^+$.

[0502] 実施例３９９

4-クロロ-N-[(1-メチル-1,2,4-トリアゾール-5-イル)チオカルバモイル]デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチン(81 mg, 0.18 mmol)をDMF(1 mL)に溶解した。そこへ5-アミノ-1-メチル-1H-1,2,4-トリアゾール(22 mg, 0.18×1.2 mmol)を加えて80℃で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムを加えて飽和重曹水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 55 mg, 57.4%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 10.96 (1H, s), 10.74 (1H, d, J = 6.8 Hz), 7.91 (1H, s), 7.19 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.99 (1H, s), 4.82-4.75 (1H, m), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.77 (3H, s), 3.63 (3H, s), 3.20-3.17 (1H, m), 2.24-2.19 (2H, m), 2.08-2.01 (1H, m).

ESI-MS m/z: 532 $[M+H]^+$.

[0503] 参考例４６

2-(3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)エタノールの合成

3-ニトロ-1,2,4-トリアゾール(1.045 g, 9.16 mmol)をDMF(5 mL)に溶解した。そこへ水酸化ナトリウム水溶液(439 mg, 9.16×1.2 mmol, 0.4 mL)、2-ブロモエタノール(1.30 mL, 9.16×2 mmol)を加えて80℃で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。水を加えて酢酸エチルで抽出した。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/酢酸エチル)で精製し、標記の化合物(黄色油状物, 969 mg, 66.9%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.83 (1H, s), 5.08 (1H, t, J = 5.5 Hz), 4.37-4.35 (2H, m), 3.80-3.76 (2H, m).

ESI-MS m/z: 159 $[M+H]^+$.

[0504] 参考例４７

2-(3-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)エタノールの合成

2-(3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)エタノール(564 mg, 3.57 mmol)をエタノール(28 mL)に溶解した。そこへ10%パラジウム-炭素(56 mg)を加

えた。水素雰囲気下、室温で4時間攪拌した。反応後、セライトろ過した。溶媒を留去し、標記の化合物(黄色油状物, 518 mg, quant.)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 7.87 (1H, s), 5.17 (2H, br s), 4.85 (1H, t, J = 5.4 Hz), 3.91 (2H, t, J = 5.4 Hz), 3.64 (2H, q, J = 5.4 Hz).

ESI-MS m/z: 129[M+H]$^+$.

[0505] 実施例４００

4-クロロ-N-{[1-(2-ヒドロキシエチル)-1,2,4-トリアゾール-3-イル]チオカルバモイル}デアセチルコルヒチンの合成

4-クロロ-7-イソチオシアネート7-デ(アセトアミド)コルヒチン(124 mg, 0.29 mmol)をDMF(3 mL)に溶解した。そこへ2-(3-アミノ-1H-1,2,4-トリアゾール-1-イル)エタノール(55 mg, 0.29×1.5 mmol)を加えて80℃で一晩攪拌した。反応後、溶媒を留去した。クロロホルムを加えて飽和重曹水で洗った。硫酸マグネシウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Biotage Isolera One, SANP 25 g, クロロホルム/メタノール)で精製し、標記の化合物(黄色固体, 93 mg, 57.1%)を得た。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 11.20 (1H, s), 10.49 (1H, d, J = 6.8 Hz), 8.51 (1H, s), 7.19 (1H, d, J = 10.7 Hz), 7.06 (1H, d, J = 10.7 Hz), 6.97 (1H, s), 5.02 (1H, t, J = 5.4 Hz), 4.85-4.79 (1H, m), 4.18 (2H, t, J = 5.1 Hz), 3.92 (3H, s), 3.89 (6H, s), 3.74 (2H, q, J = 5.4 Hz), 3.63 (3H, s), 3.19-3.14 (1H, m), 2.29-2.19 (2H, m), 2.06-1.99 (1H, m).

ESI-MS m/z: 562 [M+H]$^+$.

[0506] 試験例１

（in vitro細胞障害活性試験）

（方法）

ヒト癌由来の腫瘍細胞2種類、すなわちA549（肺癌）、HT-29（大腸癌）をAmerican Type Culture Collection（ATCC）より購入して実験に使用した。10%牛胎仔血清（FBS）、10μg/mLゲンタマイシンを含むDMEM/F-12培地（以下培地と記述）で1 × 10^4 cells/1.9mLになるように調整した細胞浮遊液を、96ウ

ェルプレートに1ウェルあたり190 μL（1000 cells）ずつ分注し、5%CO_2、37℃の条件で一晩インキュベートした。翌日、所定の濃度の被検物質を含む培地を各ウェルに10 μLずつ添加した。96時間培養後、TetraColor One cell proliferation（生化学工業）を1ウェルあたり10 μLずつ加え、60分間インキュベートした後、マイクロプレートリーダーで波長450 nmにおける吸光度を測定した。

[0507] （結果）

本試験にて検討した実施例３（４－フルオロコルヒチン）、実施例５（４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）コルヒチン）、実施例６（４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン）、実施例１３（４－クロロ－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン）、実施例１４（４－クロロ－Ｎ－ホルミルデアセチルコルヒチン）及び実施例１５（４－クロロ－Ｎ－（クロロアセチル）デアセチルコルヒチン）のA549肺癌細胞に対する細胞障害活性のIC_{50}値（細胞増殖を50%抑制する薬剤の濃度）はそれぞれ16.0nM、7.6nM、8.8nM、7.9nM、10.2nM、3.5nMで、陽性対照薬であるコルヒチンの32.8nMと比較して明らかに低かった(表１)。同様に、本試験にて検討した実施例３（４－フルオロコルヒチン）、実施例５（４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）コルヒチン）、実施例６（４－クロロ－Ｎ－（ｔ－ブトキシカルボニル）デアセチルコルヒチン）、実施例１３（４－クロロ－Ｎ－プロピオニルデアセチルコルヒチン）、実施例１４（４－クロロ－Ｎ－ホルミルデアセチルコルヒチン）及び実施例１５（４－クロロ－Ｎ－（クロロアセチル）デアセチルコルヒチン）のHT-29大腸癌細胞に対する細胞障害活性のIC_{50}値はそれぞれ7.3nM、1.2nM、6.7nM、3.3nM、8.7nM、1.6nMで、陽性対照薬であるコルヒチンの16.2nMと比較して明らかに低かった(表２)。以上の結果から、本試験にて検討した本発明のコルヒチン誘導体の全てが陽性対照薬であるコルヒチンよりも優れた抗癌活性を有することが示された。

[0508]