

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7256823号

(P7256823)

(45)発行日 令和5年4月12日(2023.4.12)

(24)登録日 令和5年4月4日(2023.4.4)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 405/12 (2006.01)

C 0 7 D 405/12

C S P

A 6 1 K 31/443 (2006.01)

A 6 1 K 31/443

A 6 1 K 31/4545 (2006.01)

A 6 1 K 31/4545

A 6 1 K 31/506 (2006.01)

A 6 1 K 31/506

Z N A

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 27 (全61頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-557175(P2020-557175)

(86)(22)出願日 平成31年4月17日(2019.4.17)

(65)公表番号 特表2021-522166(P2021-522166
A)

(43)公表日 令和3年8月30日(2021.8.30)

(86)国際出願番号 PCT/US2019/027932

(87)国際公開番号 WO2019/204490

(87)国際公開日 令和1年10月24日(2019.10.24)

審査請求日 令和4年3月15日(2022.3.15)

(31)優先権主張番号 62/659,408

(32)優先日 平成30年4月18日(2018.4.18)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 513137422

コンステレーション・ファーマシューテ

ィカルズ・インコーポレイテッド

CONSTELLATION PHAR

MA CEUTICALS, INC.

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02

210, ボストン, アトランティック・

アベニュー 470, スイート 1401

(74)代理人 100118902

弁理士 山本 修

(74)代理人 100106208

弁理士 宮前 徹

(74)代理人 100196508

弁理士 松尾 淳一

(74)代理人 100157923

最終頁に続く

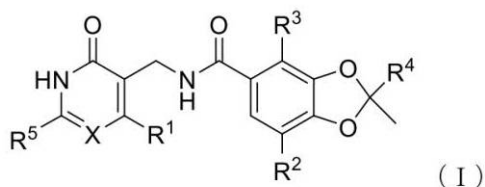
(54)【発明の名称】 メチル修飾酵素のモジュレーター、その組成物および使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式Iの化合物：

【化1】



10

またはその薬学的に許容される塩であって、式中、

R¹が、ハロ、-S (C₁-C₄) アルキル、-S (C₃-C₇) シクロアルキル、または
-S [ハロ (C₁-C₄) アルキル] であり、

Xが、CHまたはNであり、

R²が、水素、ハロ、(C₁-C₄) アルキル、またはハロ (C₁-C₄) アルキルであ
り、R³が、ハロ、(C₁-C₄) アルキル、またはハロ (C₁-C₄) アルキルであり、R⁴が、(C₃-C₇) シクロアルキルまたは4~7員のヘテロシクリルであり、それら

20

の各々が、ハロ、(C₁ - C₄) アルキル、ハロ (C₁ - C₄) アルキル、(C₁ - C₄) アルコキシ、ハロ (C₁ - C₄) アルコキシ、および -NR^aR^b から選択された 1 ~ 3 個の基で任意選択的に置換されており、

R^a が、水素、(C₁ - C₄) アルキル、またはハロ (C₁ - C₄) アルキルであり、

R^b が、(C₁ - C₄) アルキル、ハロ (C₁ - C₄) アルキル、または 4 ~ 7 員のヘテロシクリルであり、前記ヘテロシクリルが、ハロ、(C₁ - C₄) アルキル、ハロ (C₁ - C₄) アルキル、(C₁ - C₄) アルコキシ、およびハロ (C₁ - C₄) アルコキシから選択された 1 ~ 3 個の基で任意選択的に置換されているか、あるいは、

R^a および R^b が、それらが結合している窒素原子と一緒に、ハロ、(C₁ - C₄) アルキル、ハロ (C₁ - C₄) アルキル、および -OR^c から選択された 1 ~ 3 個の基で任意選択的に置換されている 4 ~ 7 員のヘテロシクリルを形成し、

R^c が、(C₁ - C₄) アルキル、ハロ (C₁ - C₄) アルキル、または (C₃ - C₇) シクロアルキルであり、

R⁵ が、ハロ、(C₁ - C₄) アルキル、またはハロ (C₁ - C₄) アルキルである、化合物またはその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】

R¹ が、ハロまたは -S (C₁ - C₄) アルキルであり、

R² が、ハロであり、

R³ が、(C₁ - C₄) アルキルであり、

R⁴ が、(C₃ - C₇) シクロアルキルまたは (C₄ - C₇) ヘテロシクリルであり、それらの各々が、ハロ (C₁ - C₄) アルキルおよび -NR^aR^b から選択された 1 ~ 2 個の基で任意選択的に置換されており、

R^a が、水素または (C₁ - C₄) アルキルであり、

R^b が、(C₁ - C₄) アルキルまたは (C₄ - C₇) ヘテロシクリルであり、前記ヘテロシクリルが、ハロ (C₁ - C₄) アルキルで任意選択的に置換されているか、あるいは

R^a および R^b が、それらが結合している窒素原子と一緒に、ハロおよび -OR^c から選択される 1 ~ 3 個の基で任意選択的に置換されている 4 ~ 7 員の窒素含有ヘテロシクリルを形成し、

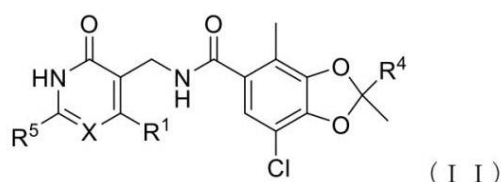
R^c が、(C₁ - C₄) アルキル、ハロ (C₁ - C₄) アルキル、または (C₃ - C₇) シクロアルキルであり、

R⁵ が、ハロまたは (C₁ - C₄) アルキルである、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記化合物が、式 I I :

【化 2】



のもの、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 または 2 に記載の化合物。

【請求項 4】

R¹ が、クロロである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5】

R¹ が、-SCH₃ である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 6】

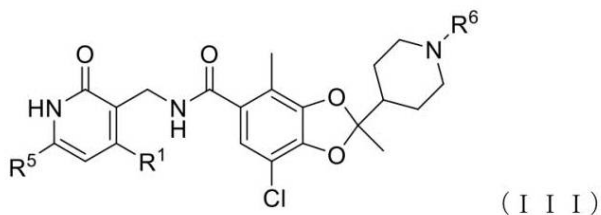
R⁴ が、シクロヘキシルまたはピペリジニルであり、それらの各々が、ハロ (C₁ - C₄) アルキルおよび -NR^aR^b から選択された 1 ~ 2 個の基で任意選択的に置換されてい

る、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 7】

前記化合物が、式 I I I :

【化 3】



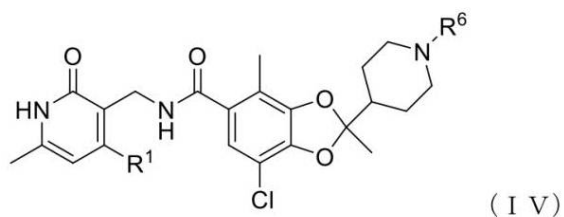
10

のもの、またはその薬学的に許容される塩であって、式中、 R^6 が、ハロ ($C_1 - C_4$) アルキルである、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 8】

前記化合物が、式 I V :

【化 4】



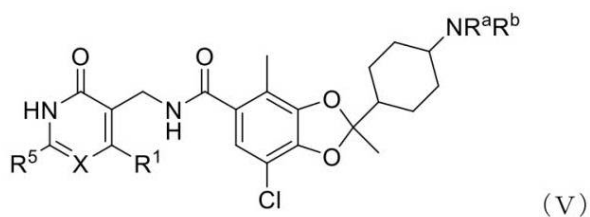
20

のもの、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 9】

前記化合物が、式 (V) :

【化 5】



30

のもの、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の化合物。

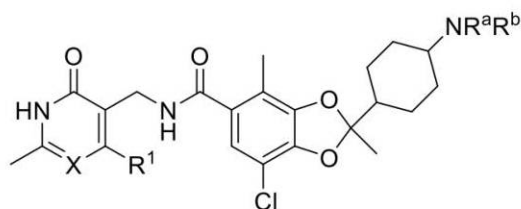
【請求項 10】

前記化合物が、式 :

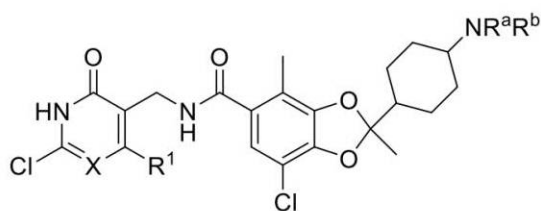
40

50

【化 6】



(VI)、もしくは



(VII)

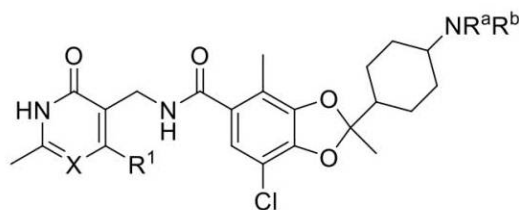
のもの、

またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1～6 および 9 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 1】

前記化合物が、式：

【化 7】



(VI)

のもの、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1～6、9、および 10 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 2】

R^b が、 $(C_1 - C_4)$ アルキルまたはオキセタニルであり、前記オキセタニルが、ハロ $(C_1 - C_4)$ アルキルで任意選択的に置換されているか、または R^a および R^b が、それらが結合している窒素原子と一緒に、ハロもしくは $-OR^c$ で任意選択的に置換されているアゼチジニルを形成する、請求項 1～6 および 9～11 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 3】

R^a が、水素またはメチルであり、 R^b が、メチルまたはオキサタニルであり、式中、前記オキセタニルが、 $-CH_2F$ または $-CF_3$ で任意選択的に置換されている、請求項 1～6 および 9～12 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 4】

R^a および R^b が、それらが結合している窒素原子と一緒に、1～2 個のフルオロまたは $-OR^c$ で任意選択的に置換されているアゼチジニルを形成し、 R^c が、 $-CH_3$ 、 $-CHF_2$ 、またはシクロプロピルである、請求項 1～6 および 9～13 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 5】

前記化合物が、式：

10

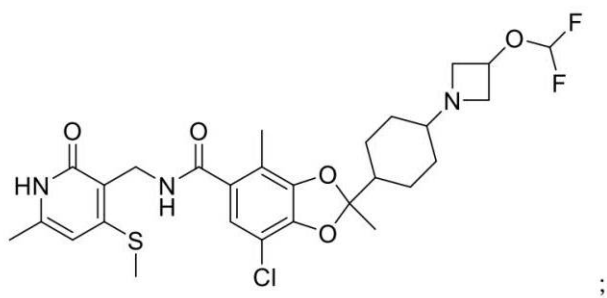
20

30

40

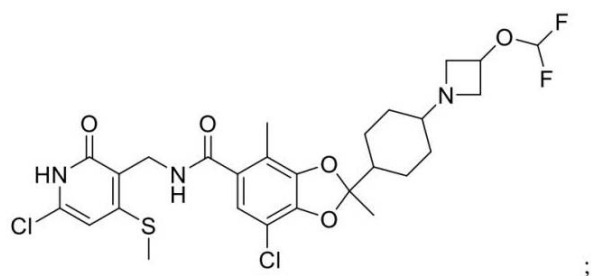
50

【化 8 - 1】

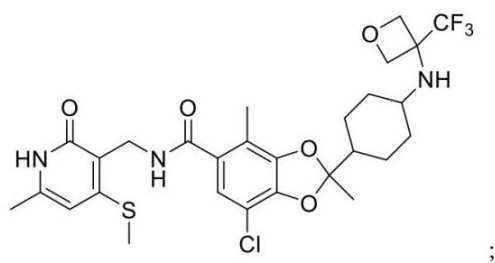


10

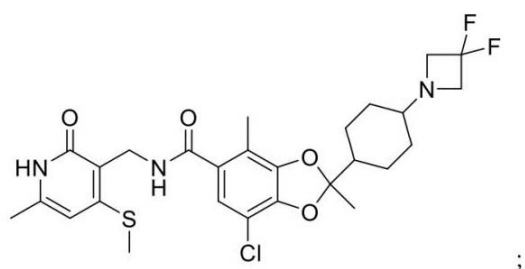
【化 8 - 2】



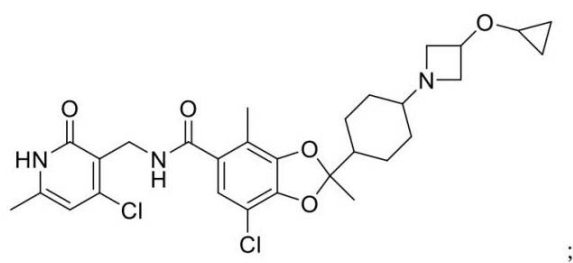
20



30

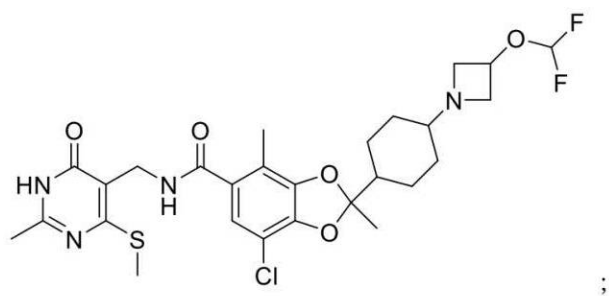


40

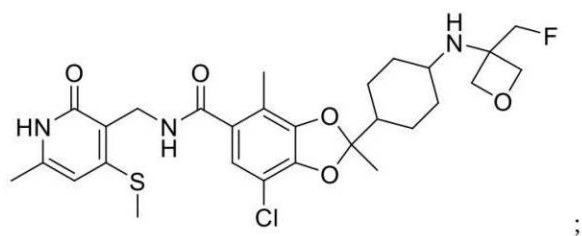


50

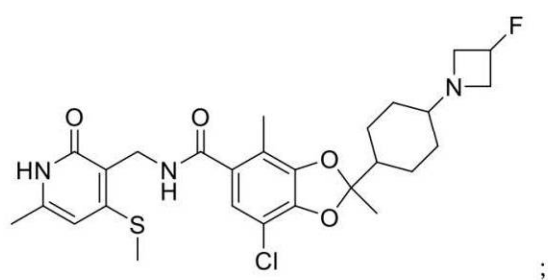
【化 8 - 3】



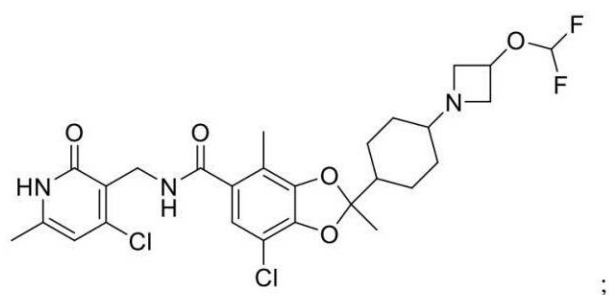
10



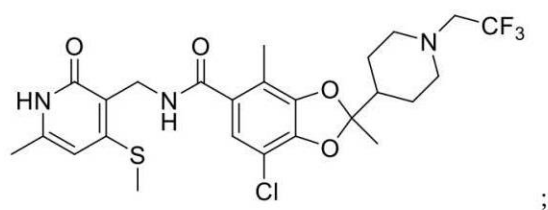
20



30

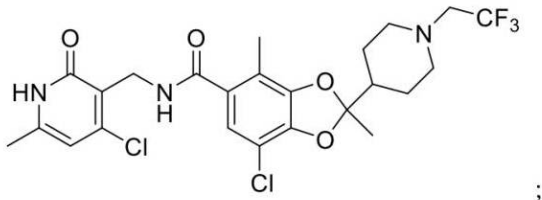


40

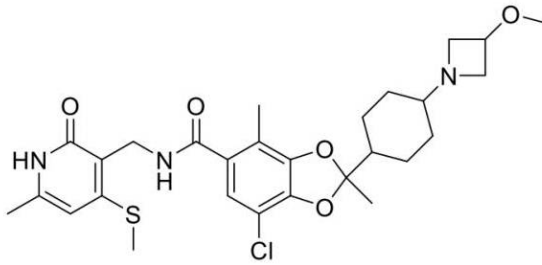


50

【化 8 - 4】

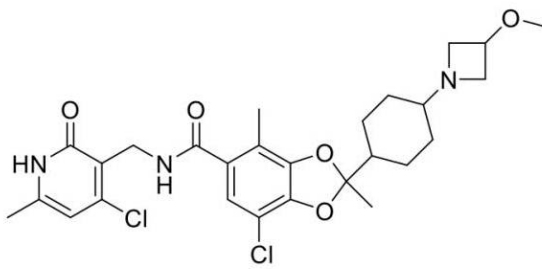


;



10

、もしくは



20

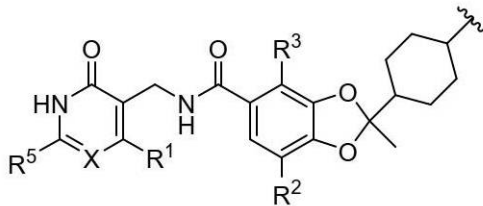
;

のもの、またはその薬学的に許容される塩である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 1 6】

前記

【化 9】



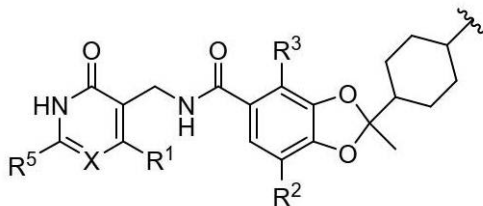
30

基および N R^a R^b が、前記シクロヘキシルを中心にトランス配向している、請求項 1 ～ 6 および 9 ～ 15 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 7】

前記

【化 1 0】



40

基および N R^a R^b が、前記シクロヘキシルを中心にシス配向している、請求項 1 ～ 6 および 9 ～ 15 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 1 8】

50

1, 3-ジオキサニルのキラル中心の立体化学的配置が、Rである、請求項1～17のいずれか一項に記載の化合物。

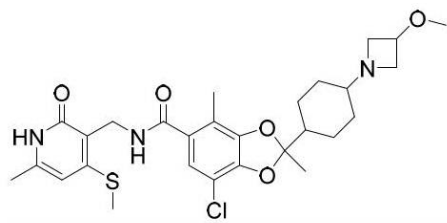
【請求項19】

1, 3-ジオキサニルのキラル中心の立体化学的配置が、Sである、請求項1～17のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項20】

前記化合物が、式：

【化11】



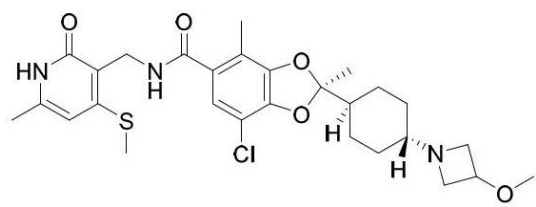
10

のもの、またはその薬学的に許容される塩である、請求項1に記載の化合物。

【請求項21】

前記化合物が、式：

【化12】



20

のもの、またはその薬学的に許容される塩である、請求項20に記載の化合物。

【請求項22】

請求項1～21のいずれか一項に記載の化合物またはその薬学的に許容される塩、および薬学的に許容される担体を含む、薬学的組成物。

30

【請求項23】

対象の癌を治療するために用いる、請求項22に記載の薬学的組成物であって、請求項1～21のいずれか一項に記載の化合物もしくはその薬学的に許容される塩の有効量が対象に投与される、前記薬学的組成物。

【請求項24】

前記癌が、乳癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌腫、多形性膠芽腫癌、膀胱癌、黒色腫、気管支癌、リンパ腫、胆管肉腫、多発性骨髄腫、肺癌、卵巣癌、および肝臓癌から選択される、請求項23に記載の薬学的組成物。

【請求項25】

請求項1～21のいずれか一項に記載の化合物もしくはその薬学的に許容される塩の、薬学的組成物の製造における使用。

40

【請求項26】

前記薬学的組成物は、対象の癌を治療するために用いられる、請求項25に記載の使用。

【請求項27】

前記癌が、乳癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌腫、多形性膠芽腫癌、膀胱癌、黒色腫、気管支癌、リンパ腫、胆管肉腫、多発性骨髄腫、肺癌、卵巣癌、および肝臓癌から選択される、請求項26に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

関連出願

本出願は、2018年4月18日出願の米国仮出願第62/659,408号の優先権の利益を主張し、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

真核生物のクロマチンは、ヌクレオソームと呼ばれる高分子複合体で構成されている。ヌクレオソームは、ヒストンタンパク質H2A、H2B、H3、およびH4の各々の2つのサブユニットを有するタンパク質オクタマーの周りを包む147個の塩基対のDNAを有する。ヒストンタンパク質は翻訳後修飾を受け、次にクロマチン構造および遺伝子発現に影響を与える。ヒストンに見られる翻訳後修飾の1つの種類は、リジンおよびアルギニン残基のメチル化である。ヒストンのメチル化は、真核生物の遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしている。メチル化はクロマチン構造に影響を与え、転写の活性化と抑制との両方に関連している (Zhang and Reinberg, Genes Dev. 15:2343-2360, 2001)。ヒストンからのメチル基の結合および除去を触媒する酵素は、遺伝子サイレンシング、胚出現、細胞増殖、および他のプロセスに関与している。

【0003】

ヒストンメチラーゼの1つの部類は、約130個のアミノ酸を含むSETドメインの存在を特徴とする。EZH2は、ヒトのSETドメインを含有するメチラーゼの一例である。EZH2は、EED (胚性外胚葉の出現) およびSUZ12 (ゼスト12ホモログの抑制因子) と会合して、PRC2 (ポリコム群抑制複合体2) として知られる複合体を形成し、これはリジン27のヒストンH3をトリメチル化する能力を有する (Cao and Zhang, Mol. Cell 15:57-67, 2004)。PRC2複合体はまた、RBAP46およびRBAP48サブユニットを含み得る。別の例は、関連するメチラーゼEZH1である。

【0004】

様々な異なる癌の種類に関する多くの研究によって、EZH2の発癌活性が示されている。約15~20%のGCB-DLBCLは、EZH2 (Y641残基) の機能獲得型変異を含み、これらの細胞は、インビトロとインビボとの両方でEZH2阻害に対して過敏である (McCabe et al., 2012; Bradley et al., 2014)。細胞株実験では、EZH2の過剰発現は、細胞浸潤、軟寒天での成長、および運動性を誘発し、一方EZH2のノックダウンは、細胞増殖および細胞浸潤を阻害する (Kleer et al., 2003, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 100:11606-11611; Varambally et al., (2002), "The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer," Nature 419, 624-629)。EZH2は、とりわけE-カドヘリン、DAB2IP、およびRUNX3を含むいくつかの腫瘍抑制因子の発現を抑制することが示されている。異種移植モデルでは、EZH2ノックダウンは、腫瘍成長および転移を抑制する。マウスモデルにおけるEZH2の下方調節が、前立腺癌の転移を阻止することが示されている (Min et al., "An oncogene-tumor suppressor cascade drives metastatic prostate cancer by coordinately activating Ras and nuclear factor-kappaB," Nat Med. 2010 Mar; 16(3):286-94)。最近、EZH2が、神経内分泌腫瘍で過剰発現し、マウス腫瘍でのEZH2の阻害が、アンドロゲン依存性を回復させることが実証された (Ku et al., Science, 355, 2017)。EZH2の過剰発現は、乳癌などのある特定の癌の攻撃性に関連する (Kleer et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 100:11606-11611, 2003)。最近の研究はまた、前立腺癌特異的発癌性融合遺伝子TMPRSS2-ERGが、EZH2の直接的な活性化を介して抑制的なエピジェネテ

10

20

30

40

50

イクスのプログラムを誘発することを示唆している (Yu et al., "An Integrated Network of Androgen Receptor, Polcomb, and TMPRSS2-ERG Gene Fusions in Prostate Cancer Progression," Cancer Cell. 2010 May 18; 17 (5): 443-454)。

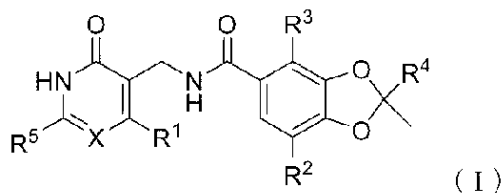
【0005】

多様な生物学的プロセスの制御におけるそれらの役割を考慮すると、メチル修飾酵素、具体的にはEZH2およびその変異形態は、調節の魅力的な標的である。

【発明の概要】

【0006】

ここで、本明細書に記載の化合物、およびその薬学的に許容される組成物が、EZH2の活性を調節することが見出されている (例えば、表5を参照されたい)。そのような化合物としては、構造式I:



のもの、またはその薬学的に許容される塩が挙げられ、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、およびXの各々が、本明細書で定義されている。

【0007】

一態様ではまた、本明細書に記載のある特定の化合物は、増加した滞留時間 (例えば、 >100 時間)、および向上した透過性を有することが見出されている。滞留時間の増加 (すなわち、より遅い解離速度) および/または透過性は、細胞効力の改善と関連することが見出されている。

【0008】

開示の化合物、薬学的に許容される塩、および薬学的に許容される組成物は、メチル修飾酵素に関連する多様な状態を治療するのに有用である。これらの状態としては、例えば、1種以上の癌が挙げられる。

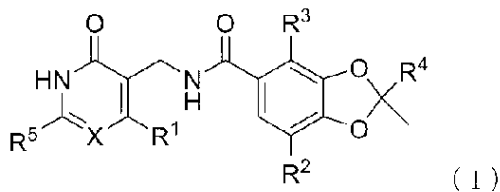
【発明を実施するための形態】

【0009】

1. 化合物の一般的な説明

式I:

【化2】



の化合物、またはその薬学的に許容される塩であって、式中、

R^1 が、ハロ、 $-S(C_1-C_4)$ アルキル、 $-S(C_3-C_7)$ シクロアルキル、または $-S$ [ハロ (C_1-C_4) アルキル] であり、

Xが、CHまたはNであり、

R^2 が、水素、ハロ、(C_1-C_4) アルキル、またはハロ (C_1-C_4) アルキルであり、

10

20

30

40

50

R^3 が、ハロ、 (C_1-C_4) アルキル、またはハロ (C_1-C_4) アルキルであり、
 R^4 が、 (C_3-C_7) シクロアルキルまたは4～7員のヘテロシクリルであり、それらの各々が、ハロ、 (C_1-C_4) アルキル、ハロ (C_1-C_4) アルキル、 (C_1-C_4) アルコキシ、ハロ (C_1-C_4) アルコキシ、および $-NR^aR^b$ から選択された1～3個の基で任意選択的に置換されており、

R^a が、水素、 (C_1-C_4) アルキル、またはハロ (C_1-C_4) アルキルであり、
 R^b が、 (C_1-C_4) アルキル、ハロ (C_1-C_4) アルキル、または4～7員のヘテロシクリルであり、当該ヘテロシクリルが、ハロ、 (C_1-C_4) アルキル、ハロ (C_1-C_4) アルキル、 (C_1-C_4) アルコキシ、およびハロ (C_1-C_4) アルコキシから選択された1～3個の基で任意選択的に置換されているか、あるいは、

R^a および R^b が、それらが結合している窒素原子と一緒にあって、ハロ、 (C_1-C_4) アルキル、ハロ (C_1-C_4) アルキル、および $-OR^c$ から選択された1～3個の基で任意選択的に置換されている4～7員のヘテロシクリルを形成し、

R^c が、 (C_1-C_4) アルキル、ハロ (C_1-C_4) アルキル、または (C_3-C_7) シクロアルキルであり、

R^5 が、ハロ、 (C_1-C_4) アルキル、またはハロ (C_1-C_4) アルキルである、化合物またはその薬学的に許容される塩が提供される。

【0010】

2. 定義

複数の結合点を有し得る化学基を説明することに関連して使用されるとき、ハイフン(—)は、定義されている不定のものへのその基の結合点を示す。例えば、 $-S(C_3-C_7)$ シクロアルキルおよび $-S$ [ハロ (C_1-C_4) アルキル]は、この基の結合点が硫黄原子上にあることを意味する。

【0011】

本明細書で使用される「ハロ」および「ハロゲン」という用語は、フッ素(フルオロ、 $-F$)、塩素(クロロ、 $-Cl$)、臭素(ブロモ、 $-Br$)、およびヨウ素(ヨード、 $-I$)から選択された原子を指す。

【0012】

本明細書で使用される「アルキル」という用語は、特に明記されない限り、1～10個の炭素原子を有する一価の飽和の、直鎖または分岐鎖炭化水素ラジカルを指す。アルキルラジカルの例としては、限定されないが、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、イソブチル、 sec -ブチル、 sec -ペンチル、イソペンチル、 $tert$ -ブチル、 n -ペンチル、ネオペンチル、 n -ヘキシル、 sec -ヘキシルなどが挙げられる。

【0013】

「ハロアルキル」という用語は、ハロゲンがフッ素、塩素、臭素、およびヨウ素から独立して選択されたモノ、ポリ、およびペルハロアルキル基を含む。

【0014】

「アルコキシ」は、酸素リンカーを介して別の部分に結合しているアルキル基である($-O$ (アルキル))。非限定的な例としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、およびブトキシが挙げられる。

【0015】

「ハロアルコキシ」は、例えば、限定されないが、 $-OCHCF_2$ または $-OCF_3$ などの、酸素原子を介して別の部分に結合しているハロアルキル基である。

【0016】

「シクロアルキル」という用語は、3～12員(例えば、3～7員)の単環式、二環式(例えば、架橋またはスピロ二環式環)、または多環式(例えば、三環式)の、完全に飽和している炭化水素環系を指す。単環式シクロアルキル基としては、限定されないが、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、およびシクロオクチルが挙げられる。架橋二環式シクロアルキル基としては、限定されないが

10

20

30

40

50

、ビスクロ [3. 2. 1] オクタン、ビスクロ [2. 2. 1] ヘプタン、ビスクロ [3. 1. 0] ヘキサン、ビスクロ [1. 1. 1] ペンタンなどが挙げられる。スピロ二環式シクロアルキル基としては、例えば、スピロ [3. 6] デカン、スピロ [4. 5] デカンなどが挙げられる。縮合シクロアルキル環としては、例えば、デカヒドロナフタレン、オクタヒドロペンタレンなどが挙げられる。任意選択的に置換されているか、または置換されていると特定される場合、シクロアルキル上の置換基（例えば、任意選択的に置換されているシクロアルキルの場合）は、任意の置換可能な位置に存在し得、これは例えば、シクロアルキル基が結合している位置が挙げられる。

【0017】

「ヘテロシクリル」という用語は、N、O、およびSから独立して選択された1～4個のヘテロ原子を含有する3～12員（例えば、4、5、6、および7員）の飽和のまたは部分的に不飽和の複素環を意味する。これは、単環式、二環式（例えば、架橋、縮合、またはスピロ二環式環）、または三環式であり得る。「複素環」、「ヘテロシクリル」、「ヘテロシクリル環」、「複素環式基」、「複素環式部分」、および「複素環式ラジカル」という用語は、本明細書では互換的に使用される。ヘテロシクリル環は、安定した構造を生じる、任意のヘテロ原子または炭素原子でそのペンダント基に結合することができる。そのような飽和のまたは部分的に不飽和の複素環式ラジカルの例としては、限定されないが、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロチエニル、テラヒドロピラニル、ピロリジニル、ピリジノニル、ピロリドニル、ピペリジニル、オキサゾリジニル、ピペラジニル、ジオキサニル、ジオキサラニル、モルホリニル、ジヒドロフラニル、ジヒドロピラニル、ジヒドロピリジニル、テトラヒドロピリジニル、ジヒドロピリミジニル、オキセタニル、アゼチジニル、およびテトラヒドロピリミジニルが挙げられる。ヘテロシクリル基は、単環式または二環式であり得る。「ヘテロシクリル」という用語としてはまた、例えば、テトラヒドロナフチリジン、インドリノン、ジヒドロピロロトリアゾール、イミダゾピリミジン、キノリノン、ジオキサスピロデカンなどの、例えば別の不飽和複素環式ラジカルまたはアリールまたはヘテロアリール環に縮合した不飽和複素環式ラジカルが挙げられる。任意選択的に置換されているか、または置換されていると特定される場合、ヘテロシクリル上の置換基（例えば、任意選択的に置換されているヘテロシクリルの場合）は、任意の置換可能な位置に存在し得、これは例えば、ヘテロシクリル基が結合している位置が挙げられる。

【0018】

「スピロ」という用語は、1つの環原子（例えば、炭素）を共有する2つの環を指す。

【0019】

「縮合」という用語は、2つの隣接する環原子を互いに共有する2つの環を指す。

【0020】

「架橋」という用語は、3つ以上の環原子を互いに共有する2つの環を指す。

【0021】

本明細書で使用される場合、「幾何異性体」は、シクロアルキル環との関係で置換基原子の配向が異なる異性体、すなわち、シスまたはトランス異性体を指す。開示の化合物が、特定のシスまたはトランス幾何異性体の形態を示さずに構造によって命名または描写されているとき、名前または構造は、他の幾何異性体を含まない1つの幾何異性体、幾何異性体の混合物、または対応する幾何異性体と比較して1つの幾何異性体が豊富な混合物を包含すると理解されるべきである。

【0022】

特に明記されない限り、開示の化合物の立体化学が構造によって命名または描写されるとき、その命名または描写された立体異性体は、他のすべての立体異性体と比較して、少なくとも60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、99重量%、または99.9重量%純粋である。単一エナンチオマーが構造によって命名または描写されるとき、その描写または命名されたエナンチオマーは、少なくとも60重量%、70重量%、80重量%、90重量%、99重量%、または99.9重量%光学的に純粋である。重量での光

学純度パーセントは、エナンチオマーの重量とその光学異性体の重量との合計に対するエナンチオマーの重量の比である。エナンチオマーは、当業者に既知の方法によって、例えば、例えば結晶化によって分離することができるジアステレオ異性体の塩の形成によって；例えば結晶化、超臨界流体もしくは液体クロマトグラフィーによって分離することができるジアステレオ異性体誘導体もしくは複合体の形成によって；1つのエナンチオマーとエナンチオマー特異的試薬との選択的反応、例えば酵素的エステル化；または、キラル環境、例えばキラル担体上、例えば、結合したキラル配位子を有するシリカ上で、もしくはキラル溶媒の存在下での超臨界流体もしくは液体クロマトグラフィーによって分割することができる。特定のエナンチオマーはまた、光学活性試薬、基質、触媒、もしくは溶媒を使用する不斉合成によって、または不斉変換によって一方のエナンチオマーを他方に変換

10

【0023】

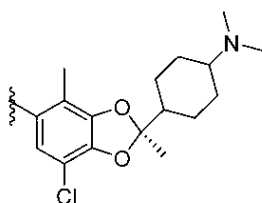
特に明記されない限り、開示の化合物が、立体化学を示さずに構造によって命名または描写され、化合物が、少なくとも1つのキラル中心、または少なくとも1つの幾何異性体、またはそれらの両方を有するとき、その名称または構造は、対応する光学異性体または幾何異性体を含まない化合物の1つのエナンチオマーまたは幾何異性体、化合物のラセミ体混合物、およびその対応する光学異性体または幾何異性体と比較して1つのエナンチオマーまたは幾何異性体が豊富な混合物を包含する。

【0024】

特に明記されない限り、開示の化合物の立体化学中心の一部のみが構造によって描写または命名されるとき、命名または描写された立体配置は、残りの立体配置と比較して、例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、99%、または99.9%のモル過剰で豊富である。例えば、部分構造：

20

【化3】



30

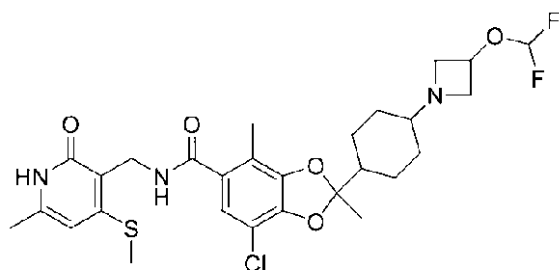
は、キラル炭素を中心とする立体配置が、Rとして立体化学的に豊富（例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、99%、または99.9%のモル過剰）であること、およびシクロヘキシルを中心とする幾何形状が、シスもしくはトランス、またはそれらの混合物であり得ることを意味する。

【0025】

ある特定の場合では、開示の化合物は、立体化学を示さずに構造によって描写されるが、立体化学的に豊富であると識別される（例えば、幾何異性体が不可能な場合の、「単一エナンチオマー、単一幾何異性体」、または「単一エナンチオマー」）。例えば、特に明記されない限り、

40

【化 4】



実施例 1

(単一エナンチオマー、単一幾何異性体)

10

は、キラルジオキサニル炭素を中心とする立体配置が、Rとして立体化学的に豊富（例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、99%、または99.9%のモル過剰）であるか、またはSとして立体化学的に豊富（例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、99%、または99.9%のモル過剰）であり、シクロヘキシル環を中心とする幾何的立体配置が、シスとして豊富（例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、99%、または99.9%のモル過剰）であるか、またはトランスとして豊富（例えば、少なくとも60%、70%、80%、90%、99%、または99.9%のモル過剰）であることを意味する。

【0026】

20

本明細書で使用される「患者」という用語は、哺乳動物など、およびヒトなどの動物を意味する。「対象」および「患者」という用語は、互換的に使用され得る。

【0027】

「薬学的に許容される担体」という用語は、担体ともに配合される化合物の薬理学的活性を破壊しない非毒性担体、アジュバント、またはビヒクルを指す。本明細書に記載の組成物で使用され得る薬学的に許容される担体、アジュバント、またはビヒクルとしては、限定されないが、イオン交換剤、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、リン酸などの緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物脂肪酸の部分的グリセリド混合物、水、硫酸プロタミンなどの塩または電解質、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレンーポリオキシプロピレンーブロックポリマー、ポリエチレングリコール、およびウール脂肪が挙げられる。

30

【0028】

「治療」、「治療する」、および「治療すること」という用語は、本明細書に記載されるように、疾患もしくは障害、またはそれらの1つ以上の症状の進行を逆転、緩和、または阻害することを指す。症状が回復した後、例えば再発を遅らせるために治療を続けてもよい。

【0029】

40

疾患、障害、および状態は、本明細書では互換的に使用される。

【0030】

「有効量」または「治療的有效量」という用語は、対象の生物学的または医学的応答を誘導するであろう本明細書に記載の化合物の量、例えば、0.01~100mg/体重kg/日の投与量を指す。「対象」および「患者」という用語は、互換的に使用され得、治療を必要とする哺乳動物、例えば、コンパニオンアニマル（例えば、イヌ、ネコなど）、家畜（例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ヒツジ、ヤギなど）、および実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモットなど）を意味する。典型的には、対象は、治療を必要とするヒトである。

【0031】

50

「阻害する」、「阻害」、または「阻害すること」という用語は、生物学的活性またはプロセスのベースライン活性の減少を含む。

【0032】

本明細書に記載の化合物は、薬学的に許容される塩の形態で存在し得る。医薬品で使用する場合、本明細書に記載の化合物の塩は、非毒性の「薬学的に許容される塩」を指す。薬学的に許容される塩の形態としては、薬学的に許容される酸性／陰イオン性、または塩基性／陽イオン性の塩が挙げられる。本明細書に記載の化合物の好適な薬学的に許容される酸付加塩としては、例えば、無機酸（塩酸、臭化水素酸、リン酸、硝酸、および硫酸など）の塩、および有機酸（酢酸、ベンゼンスルホン酸、安息香酸、メタンスルホン酸、および *p*-トルエンスルホン酸など）の塩が挙げられる。

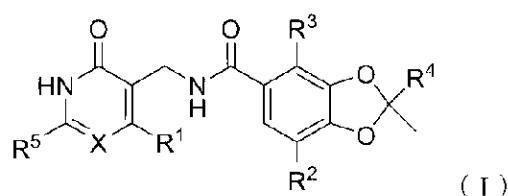
10

【0033】

3. 例示的な化合物の説明

第1の実施形態では、本開示は、式 I :

【化5】



20

の化合物、またはその薬学的に許容される塩を提供し、式中、不定のものは、式 I について上のとおりである。

【0034】

第2の実施形態では、式 I の化合物の

R^1 は、ハロまたは $-S(C_1-C_4)$ アルキルであり、

R^2 は、ハロであり、

R^3 は、 (C_1-C_4) アルキルであり、

R^4 は、 (C_3-C_7) シクロアルキルまたは (C_4-C_7) ヘテロシクリルであり、それらの各々は、ハロ (C_1-C_4) アルキルおよび $-NR^aR^b$ から選択された 1~2 個の基で任意選択的に置換されており、

30

R^a は、水素または (C_1-C_4) アルキルであり、

R^b は、 (C_1-C_4) アルキルまたは (C_4-C_7) ヘテロシクリルであり、当該ヘテロシクリルは、ハロ (C_1-C_4) アルキルで任意選択的に置換されているか、あるいは

R^a および R^b は、それらが結合している窒素原子と一緒に、ハロおよび $-OR^c$ から選択された 1~3 個の基で任意選択的に置換されている 4~7 員の窒素含有ヘテロシクリルを形成し、

R^c は、 (C_1-C_4) アルキル、ハロ (C_1-C_4) アルキル、または (C_3-C_7) シクロアルキルであり、

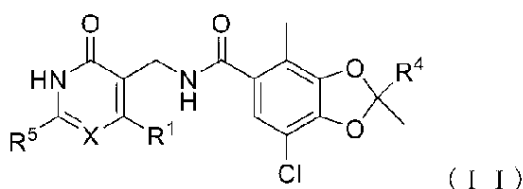
R^5 は、ハロまたは (C_1-C_4) アルキルである。

40

【0035】

第3の実施形態では、式 I の化合物は、式 II :

【化6】



50

のもの、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、残りの不定のものは、式Ⅰまたは第2の実施形態について上記したとおりである。

【0036】

第4の実施形態では、式Ⅰまたは式ⅠⅠの化合物の R^1 は、クロロであり、残りの不定のものは、式Ⅰまたは第2の実施形態について上記したとおりである。

【0037】

第5の実施形態では、式Ⅰまたは式ⅠⅠの化合物の R^1 は、 $-SCH_3$ であり、残りの不定のものは、式Ⅰまたは第2の実施形態について上記したとおりである。

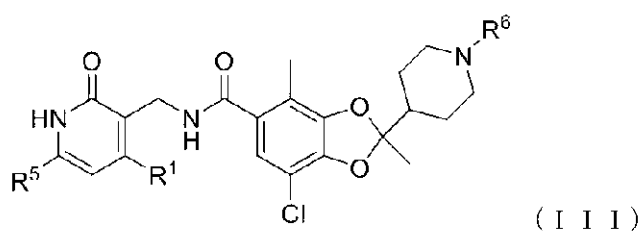
【0038】

第6の実施形態では、式Ⅰまたは式ⅠⅠの化合物の R^4 は、シクロヘキシルまたはピペリジニルであり、これらの各々は、ハロ（ $C_1 - C_4$ ）アルキルおよび $-NR^aR^b$ から選択された1～2個の基で任意選択的に置換されており、残りの不定のものは、式Ⅰ、または第2、第4、もしくは第5の実施形態について上記したとおりである。

【0039】

第7の実施形態では、式Ⅰまたは式ⅠⅠの化合物は、式ⅠⅠⅠ：

【化7】

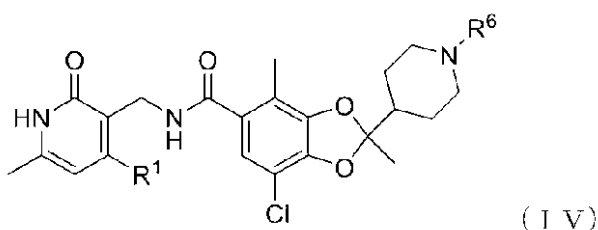


のもの、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、 R^6 は、ハロ（ $C_1 - C_4$ ）アルキルであり、残りの不定のものは、式Ⅰ、または第2、第4、もしくは第5の実施形態について上記したとおりである。

【0040】

第8の実施形態では、式Ⅰ、式ⅠⅠ、または式ⅠⅠⅠの化合物は、式ⅠⅤ：

【化8】

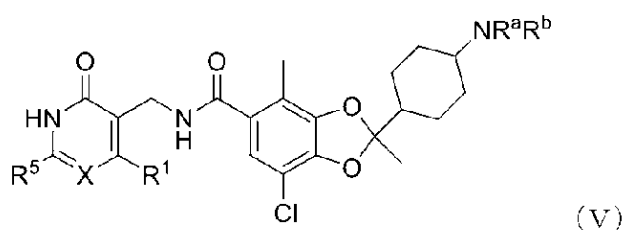


のもの、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、残りの不定のものは、式Ⅰ、または第2、第4、第5、もしくは第7の実施形態について上記したとおりである。

【0041】

第9の実施形態では、式Ⅰまたは式ⅠⅠの化合物は、式Ⅴ：

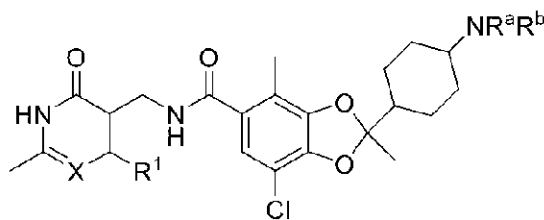
【化9】



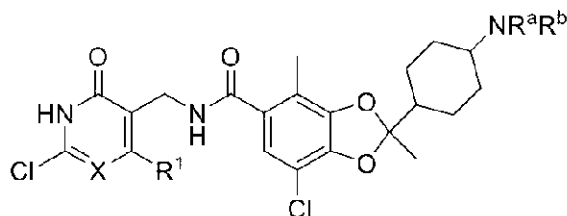
のもの、またはその薬学的に許容される塩であり、式中、残りの不定のものは、式Ⅰ、または第２、第４、もしくは第５の実施形態について上記したとおりである。

【００４２】

第１０の実施形態では、式Ⅰ、式ⅠⅠ、または式Ⅴの化合物は、式ⅤⅠもしくはⅤⅠⅠ：
【化１０】



(ⅤⅠ)、もしくは



(ⅤⅠⅠ)

のもの、

またはその薬学的に許容される塩であり、式中、残りの不定のものおよび特色は、式Ⅰ、または第２、第４、もしくは第５の実施形態について上記したとおりである。

【００４３】

第１１の実施形態では、式Ⅰ、式ⅠⅠ、式Ⅴ、式ⅤⅠ、および式ⅤⅠⅠの化合物の R^b は、(C₁–C₄) アルキルまたはオキサタニル (oxatanyl) であり、当該オキサタニルは、ハロ (C₁–C₄) で任意選択的に置換されているか、または R^a および R^b は、それらが結合している窒素原子と一緒に、ハロもしくは $-OR^c$ で任意選択的に置換されているアゼチジニルを形成し、残りの不定のものおよび特色は、式Ⅰ、または第２、第４、もしくは第５の実施形態について上記したとおりである。

【００４４】

第１２の実施形態では、式Ⅰ、式ⅠⅠ、式Ⅴ、式ⅤⅠ、および式ⅤⅠⅠの化合物の R^a は、水素またはメチルであり、 R^b は、メチルまたはオキサタニルであり、当該オキサタニルが、 $-CH_2F$ または $-CF_3$ で任意選択的に置換されており、残りの不定のものおよび特色は、式Ⅰ、または第２、第４、第５、もしくは第１１の実施形態について上記したとおりである。

【００４５】

第１３の実施形態では、式Ⅰ、式ⅠⅠ、式Ⅴ、式ⅤⅠ、および式ⅤⅠⅠの化合物の R^a および R^b は、それらが結合している窒素原子と一緒に、１～２個のフルオロまたは $-OR^c$ で任意選択的に置換されているアゼチジニルを形成し、 R^c は、 $-CH_3$ 、 $-CHF_2$ 、またはシクロプロピルであり、残りの不定のものおよび特色は、式Ⅰ、または第２、第４、第５、もしくは第１１の実施形態について上記したとおりである。

【００４６】

第１４の実施形態では、１，３－ジオキサニル、ならびに式Ⅰ、ⅠⅠ、Ⅴ、ⅤⅠ、およびⅤⅠⅠのうちのいずれか１つの NR^aR^b 基の立体配置は、シクロヘキシルを中心にトランス配向しており、残りの特色は、式Ⅰ、または第２、第４、第５、第６、第１１、第１２、もしくは第１３の実施形態について上記したとおりである。あるいは、１，３－ジオキサニル、ならびに式Ⅰ、ⅠⅠ、Ⅴ、ⅤⅠ、およびⅤⅠⅠの NR^aR^b 基の立体配置は、シクロヘキシルを中心にシス配向しており、残りの特色は、式Ⅰ、または第２、第４、第５、第６、第１１、第１２、もしくは第１３の実施形態について上記したとおりである。

【0047】

第15の実施形態では、式I、II、III、IV、V、VI、およびVIIのうちのいずれか1つの1, 3-ジオキサニルのキラル中心の立体化学的配置はRであり、残りの特色は、式I、または第2、第4、第5、第6、第11、第12、第13、もしくは第14の実施形態について上記したとおりである。あるいは、式I、II、III、IV、V、VI、およびVIIのうちのいずれか1つの1, 3-ジオキサニルのキラル中心の立体化学的配置はSであり、残りの特色は、式I、または第2、第4、第5、第6、第11、第12、第13、もしくは第14の実施形態について上記したとおりである。

【0048】

化合物の特定の例は、例示のセクションに提供されており、本明細書の第14の実施形態の一部として挙げられる。これらの化合物の中性形態と同様に、薬学的に許容される塩も挙げられる。一態様では、本開示は、本明細書に記載の任意の化合物のラセミ形態を含む。

10

【0049】

4. 用途、配合、および投与

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の化合物またはその薬学的に許容される誘導体、および薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。提供される組成物中の化合物の量は、生物学的試料または患者の、ヒストンメチル修飾酵素またはその変異体を測定可能に調節するのに有効であるような量である。

【0050】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の組成物は、そのような組成物を必要とする患者に投与するために配合される。本明細書に記載の組成物は、経口的に、非経口的に、吸入スプレーにより、局所的に、直腸的に、経鼻的に、口腔的に、経膈的に、またはインプラントリザーバを介して投与することができる。本明細書で使用される「非経口」という用語は、皮下、静脈内、筋肉内、関節内、滑膜内、胸骨内、くも膜下腔内、肝内、病巣内、および頭蓋内注射または注入技術を含む。いくつかの実施形態では、組成物は、経口、腹腔内、または静脈内に投与される。本明細書に記載の組成物の無菌の注射可能な形態は、水性または油性の懸濁液であり得る。これらの懸濁液は、好適な分散剤または湿潤剤、および懸濁剤を使用して、当技術分野で既知の技術に従って配合され得る。

20

【0051】

いくつかの実施形態では、組成物は、経口投与される。

30

【0052】

任意の特定の患者用の特定の投与量および治療計画は、用いられる特定の化合物の活性、年齢、体重、一般的な健康状態、性別、食事、投与時間、排泄速度、薬物の組み合わせ、ならびに治療する医師の判断および治療される特定の疾患の重症度を含む、多様な要因に依存するであろう。組成物中の本明細書に記載の化合物の量は、組成物中の特定の化合物にも依存するであろう。

【0053】

本明細書に記載の化合物および組成物は一般に、エピジェネティック制御に関与する1つ以上の酵素、具体的にはEZH1およびEZH2、さらにより具体的にはEZH2およびその変異形態の活性の調節に有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物は、EZH2の活性を下方制御または抑制する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物は、EZH2活性のアンタゴニストである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物は、EZH1の活性を下方制御または抑制する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物は、EZH1活性のアンタゴニストである。

40

【0054】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、EZH1もしくはEZH2の過剰発現、および／またはEZH2基質活性を変化させる変異形態などのEZH2の変異形態の発現に関連する疾患および／または障害の治療に有用である。EZH2の欠失、ミスセンス、およびフレームシフト変異の研究は、EZH2が骨髄異形成症候群

50

(MDS) および骨髄性悪性腫瘍などの血液障害の腫瘍抑制因子として機能することを示唆している (Ernst et al., Nat Genet. 2010 Aug; 42 (8): 722-6, Nikoloski et al., Nat Genet. 2010 Aug; 42 (8): 665-7)。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、Y641N、Y641C、Y641F、Y641H、Y641S、A677G、またはA687変異を有するEZH2の存在に関連する疾患および／または障害の治療に有用である。この実施形態の特定の態様では、EZH2は、Y641N変異を有する。

【0055】

いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載の化合物、またはその薬学的に許容される塩もしくはその組成物を投与するステップを含む、EZH1もしくはEZH2の過剰発現、および／またはEZH2の変異形態の発現に関連する疾患および／または障害を患う対象を治療する方法を提供する。いくつかの実施形態では、上の方法は、対象が、EZH2を過剰発現しているか、またはEZH2の変異形態を発現しているかどうかを決定する予備ステップを追加的に含む。

【0056】

いくつかの実施形態では、EZH2の変異形態の存在に関連する疾患または障害は、ヒトB細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態では、Y641N EZH2の存在に関連する疾患および／または障害は、濾胞性リンパ腫またはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物または組成物は、骨髄異形成症候群、白血病、貧血、および血球減少症などの血液障害の治療に有用である。Sneeringer et al., "Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas," Sneeringer et al., Proc. Natl Acad. Sci. 2010 Dec; 109 (48): 20980-20985。

【0057】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、細胞増殖に関連する疾患および／または障害の治療に有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、細胞周期の誤制御またはDNA修復に関連する疾患および／または障害の治療に有用である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の化合物および組成物は、癌の治療に有用である。

【0058】

一態様では、本明細書に記載の化合物、組成物、および方法によって治療され得る癌としては、限定されないが、心臓：肉腫（血管肉腫、線維肉腫、横紋筋肉腫、脂肪肉腫）、粘液腫、横紋筋腫、線維腫、脂肪腫および奇形腫；肺：気管支癌腫（扁平上皮細胞、未分化小細胞、未分化大細胞、腺癌腫）、肺泡（細気管支）癌腫、気管支腺腫、肉腫、リンパ腫、軟骨性過誤腫、中皮腫；胃腸：食道（扁平上皮癌腫、腺癌腫、平滑筋肉腫、リンパ腫）、胃（癌腫、リンパ腫、平滑筋肉腫）、膵臓（管状腺癌腫、インスリノーマ、グルカゴノーマ、ガストリノーマ、カルチノイド腫瘍、VIP産生腫瘍）、小腸（腺癌腫、リンパ腫、カルチノイド腫瘍、カポジ肉腫、平滑筋腫、血管腫、脂肪腫、神経線維腫、線維腫）、大腸（腺癌腫、管状腺腫、絨毛腺腫、過誤腫、平滑筋腫）；泌尿生殖路：腎臓（腺癌腫、ウィルムス腫瘍（腎芽腫）、リンパ腫、白血病）、膀胱および尿道（扁平上皮癌腫、移行上皮癌腫、腺癌腫）、前立腺（腺癌腫、肉腫）、精巣（精上皮腫、奇形腫、胚性癌腫、奇形癌腫、絨毛癌腫、肉腫、間質細胞癌腫、線維腫、線維腺腫、腺腫様腫瘍、脂肪腫）；肝臓：肝癌（肝細胞癌腫）、胆管癌腫、肝芽腫、血管肉腫、肝細胞腺腫、血管腫；骨：骨原性肉腫（骨肉腫）、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性リンパ腫（細網細胞肉腫）、多発性骨髄腫、悪性巨細胞腫瘍脊索腫、骨軟骨膜軟骨腫（osteochondroma）（骨軟骨性外骨症）、軟骨腫、軟骨芽腫、軟骨粘液線維

10

20

30

40

50

腫、類骨骨腫および巨細胞腫瘍；神経系：頭蓋骨（骨腫、血管腫、肉芽腫、黄色腫、変形性骨炎）、髄膜（髄膜腫、髄膜肉腫、神経膠腫）、脳（星細胞腫、髄芽腫、神経膠腫、上衣腫、胚腫（松果体腫）、多形性膠芽腫、乏突起神経膠腫、神経鞘腫、網膜芽腫、先天性腫瘍）、脊髄神経線維腫、髄膜腫、神経膠腫、肉腫）；婦人科：子宮（子宮内膜癌腫）、子宮頸部（子宮頸癌腫、腫瘍前の子宮頸部異形成）、卵巣（卵巣癌腫（漿液性嚢胞腺癌腫、粘液性嚢胞腺癌腫、明細胞癌腫、未分類の癌腫）、顆粒膜卵胞膜細胞腫瘍、Sertoli-Leydig細胞腫瘍、未分化胚細胞腫、悪性奇形腫）、外陰部（扁平上皮癌腫、上皮内癌腫、腺癌腫、線維肉腫、黒色腫）、膣（明細胞癌腫、扁平上皮癌腫、ブドウ房状肉腫（胚性横紋筋肉腫）、卵管（癌腫）；血液性：血液（骨髓性白血病（急性および慢性）、急性リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、骨髓増殖性疾患、多発性骨髓腫、骨髓異形成症候群）、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（悪性リンパ腫）；皮膚：悪性黒色腫、基底細胞癌腫、扁平上皮癌腫、カポジ肉腫、ほくろ異形成母斑、脂肪腫、血管腫、皮膚線維腫、ケロイド、乾癬、ならびに副腎：神経芽腫が挙げられる。

【0059】

一態様では、本明細書に記載の化合物、組成物、および方法によって治療される癌は、副腎癌、腺房細胞癌腫、聴神経腫、端黒子型黒色腫、先端汗腺腫、急性好酸球性白血病、急性赤血球性白血病、急性リンパ芽球性白血病、急性巨核球性白血病、急性単球性白血病、急性前骨髄球性白血病、腺癌腫、腺様嚢胞癌腫、腺腫、腺様歯原性腫瘍、腺扁平上皮癌腫、脂肪組織新生物、副腎皮質癌腫、成人T細胞白血病／リンパ腫、アグレッシブNK細胞白血病、AIDS関連リンパ腫、胞巣型横紋筋肉腫、胞巣状軟部肉腫、エナメル上皮線維腫、未分化大細胞リンパ腫、未分化甲状腺癌、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫、血管筋脂肪腫、血管肉腫、星細胞腫、非定型奇形ラブドイド腫瘍、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞前リンパ球性白血病、B細胞リンパ腫、基底細胞癌腫、胆道癌、膀胱癌、芽腫、骨癌、プレナー腫瘍、褐色腫瘍、バーキットリンパ腫、乳癌、脳癌、癌腫、上皮内癌腫、癌肉腫、軟骨腫瘍、セメント腫、骨髓性肉腫、軟骨腫、脊索腫、絨毛癌腫、脈絡叢乳頭腫、腎臓の淡明細胞肉腫、頭蓋咽頭腫、皮膚T細胞リンパ腫、子宮頸癌、結腸直腸癌、デゴス病、線維形成性小円形細胞腫瘍、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、胚芽異形成性神経上皮腫瘍、未分化胚細胞腫、胚性癌腫、内分泌腺新生物、内胚葉性洞腫瘍、消化器系関連T細胞リンパ腫、食道癌、胎児内胎児、線維腫、線維肉腫、濾胞性リンパ腫、濾胞性甲状腺癌、神経節神経腫、胃腸癌、胚細胞腫瘍、妊娠性絨毛癌腫、巨細胞線維芽腫、骨の巨細胞腫瘍、グリア系腫瘍、多形性膠芽腫、神経膠腫、大脳神経膠腫症、グルカゴノーマ、性腺芽腫、顆粒膜細胞腫瘍、半陰陽性卵巣腫瘍、胆嚢癌、胃癌、有毛細胞白血病、血管芽腫、頭頸部癌、血管周皮腫、悪性血液疾患、肝芽腫、肝脾T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、侵襲性小葉癌腫、腸癌、腎臓癌、喉頭癌、悪性黒子、致死正中線癌腫、白血病、ライディッヒ細胞腫瘍、脂肪肉腫、肺癌、リンパ管腫、リンパ管肉腫、リンパ上皮腫、リンパ腫、急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、肝臓癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、MALTLリンパ腫、悪性線維性組織球腫、悪性末梢神経鞘腫瘍、悪性トリトン腫瘍、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、マスト細胞白血病、縦隔胚細胞腫瘍、乳房の髄様癌腫、甲状腺髄様癌、髄芽腫、黒色腫、髄膜腫、メルケル細胞癌、中皮腫、転移性尿路上皮癌腫、混合ミューラー管腫瘍、粘液性腫瘍、多発性骨髓腫、筋組織新生物、菌状息肉腫、粘液型脂肪肉腫、粘液腫、粘液肉腫、鼻咽頭癌腫、神経鞘腫、神経芽腫、神経線維腫、神経腫、結節型黒色腫、眼癌、乏突起星細胞腫、乏突起膠腫、オンコサイトーマ、視神経鞘髄膜腫、視神経腫瘍、口腔癌、骨肉腫、卵巣癌、パネコースト腫瘍、甲状腺乳頭癌、傍神経節腫、松果体芽腫、松果体細胞腫、下垂細胞腫、下垂体腺腫、下垂体腫瘍、形質細胞腫、多胚腫、前駆Tリンパ芽球性リンパ腫、中枢神経系リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、原発性腹膜癌、前立腺癌、膵臓癌、咽頭癌、腹膜偽粘液腫、腎細胞癌腫、腎髄質癌腫、網膜芽腫、横紋筋腫、横紋筋肉腫、リヒター形質転換、直腸癌、肉腫、Schwannomatosis、精上皮腫、セルトリ細胞腫瘍、性索性腺間質腫瘍、印環細胞癌腫、皮膚癌、青色小細胞腫瘍（small blue round cell tumors）、小細胞癌腫、軟組織肉腫、ソマトスタチノーマ、

10

20

30

40

50

煤煙性いぼ、脊髄腫瘍、脾辺縁帯リンパ腫、扁平上皮癌腫、滑膜肉腫、セザリー病、小腸癌、扁平上皮癌腫、胃癌、T細胞リンパ腫、精巣癌、莢膜細胞腫、甲状腺癌、移行細胞癌腫、喉癌、尿管癌、泌尿生殖器癌、尿路上皮癌腫、ブドウ膜黒色腫、子宮癌、疣贅性癌腫、視神経膠腫、外陰癌、膣癌、原発性マクログロブリン血症、ワルチン腫瘍、ウィルムス腫瘍から選択される。

【0060】

一態様では、本明細書に記載の化合物、組成物、および方法によって治療される癌は、腺癌腫、成人T細胞白血病／リンパ腫、膀胱癌、芽腫、骨癌、乳癌、脳癌、癌腫、骨髓肉腫、子宮頸癌、結腸直腸癌、食道癌、胃腸癌、多形性膠芽腫、神経膠腫、胆嚢癌、胃癌、頭頸部癌、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、腸癌、腎臓癌、喉頭癌、白血病、肺癌、リンパ腫、肝臓癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、中皮腫、多発性骨髄腫、急性骨髄性白血病（AML）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、眼癌、視神経腫瘍、口腔癌、卵巣癌、下垂体腫瘍、原発性中枢神経系リンパ腫、前立腺癌、膵臓癌、咽頭癌、腎細胞癌腫、直腸癌、肉腫、皮膚癌、脊髄腫瘍、小腸癌、胃癌、T細胞リンパ腫、精巣癌、甲状腺癌、喉癌、泌尿生殖器癌、尿路上皮癌腫、子宮癌、膣癌、およびウィルムス腫瘍から選択される。

10

【0061】

一態様では、本明細書に記載の化合物、組成物、および方法によって治療される癌は、乳癌、前立腺癌、結腸癌、腎細胞癌腫、多形性膠芽腫癌、膀胱癌、黒色腫、気管支癌、リンパ腫、および肝臓癌から選択される。

20

【0062】

本明細書に記載の状態を治療するための医薬の製造のための、本明細書に記載の化合物もしくはその薬学的に許容される塩、または開示の化合物もしくはその薬学的に許容される塩を含む組成物の使用も提供される。本明細書に記載の状態の治療に使用するための、本明細書に記載の化合物もしくはその薬学的に許容される塩、または開示の化合物もしくはその薬学的に許容される塩を含む組成物も提供される。

【0063】

例示

以下の代表的な例は、本発明を説明するのを助けることを意図しており、本発明の範囲を限定することを意図しておらず、限定すると解釈するべきではない。

30

【0064】

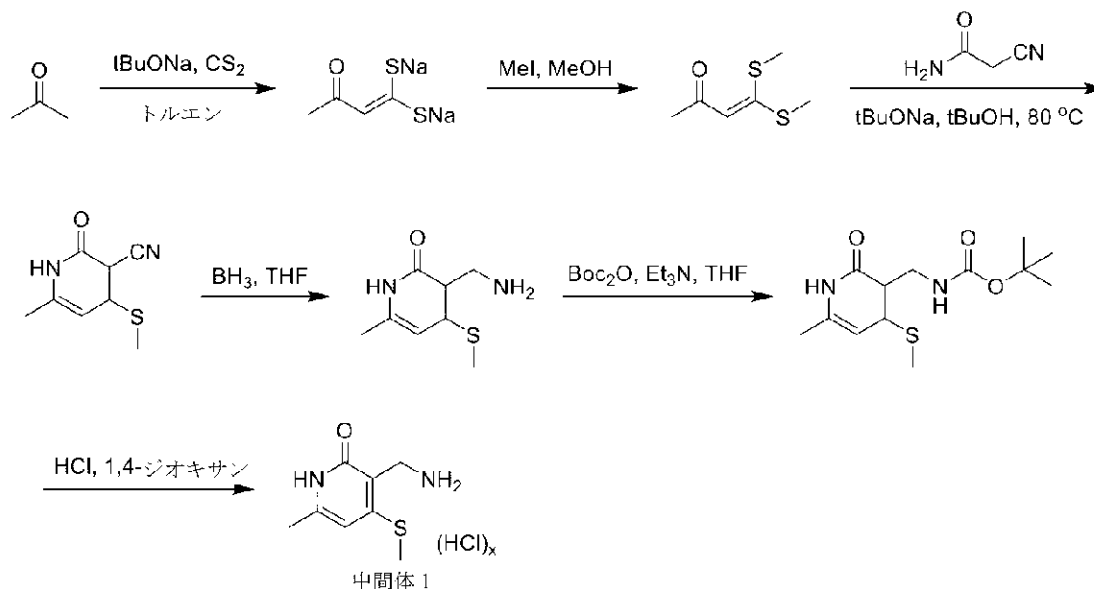
中間体の調製

中間体1：3-（アミノメチル）-6-メチル-4-（メチルチオ）ピリジン-2（1H）-オン（塩酸塩）

40

50

【化 1 1】



10

ステップ1：ナトリウム3-オキソブト-1-エン-1,1-ビス(チオラート)の合成
トルエン(30 mL)中のナトリウム *tert*-ブトキシド(16.6 g、172 mmol)の混合物を真空下で脱気し、窒素でパージした(3サイクル)。次いで、アセトン(5.0 g、6.4 mL、86 mmol)を 0°C で添加し、続いて二硫化炭素(6.6 g、5.24 mL、86 mmol)をゆっくりと添加した。得られた混合物を 0°C で4時間攪拌し、次いで濾過した。フィルターケーキを真空下で乾燥させて、表題化合物(15.4 g、粗製)を黄色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。

20

【0065】

ステップ2：4,4-ビス(メチルチオ)ブト-3-エン-2-オンの合成

メタノール(90 mL)中の3-オキソブト-1-エン-1,1-ビス(チオラート)ナトリウム(15.4 g、86.4 mmol)の溶液に、ヨードメタン(24.5 g、10.7 mL、173 mmol)をゆっくりと添加した。混合物を 70°C で1時間攪拌し、次いで濃縮乾固させた。水(30 mL)を添加し、所望の生成物を酢酸エチル(60 mL $\times$ 3 mL)で抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮して、表題化合物(6.8 g、収率42%)を褐色の油として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ ：計算値163.0、実測値163.0。 ^1H NMR(400 MHz、クロロホルム- d) δ 6.02(s, 1H)、2.45(s, 3H)、2.43(s, 3H)、2.15(s, 3H)。

30

【0066】

ステップ3：6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-カルボニトリルの合成

40

tert-ブタノール(50 mL)中の4,4-ビス(メチルチオ)ブト-3-エン-2-オン(2.9 g、18 mmol)および2-シアノアセトアミド(1.5 g、18 mmol)の溶液に、*tert*-ブトキシドナトリウム(1.9 g、20 mmol)を添加した。混合物を 80°C で12時間攪拌した(2つのバッチの反応を実施し、この段階で組み合わせた)。水(20 mL)を添加し、10%の塩酸でpHを5~6に調整した。得られた混合物を濾過し、フィルターケーキを石油エーテル(20 mL $\times$ 2)で洗浄し、次いでケーキを真空下で乾燥させて、表題化合物(4.8 g、収率74%)をオフホワイトの固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS $[\text{M}+\text{H}]^+ m/z$ ：計算値181.0、実測値181.0。 ^1H NMR(400 MHz、ジメチルスルホキシド- d_6) δ 6.27(s, 1H)、2.56(s, 3H)、2.25

50

(s、3H)。

【0067】

ステップ4：3-(アミノメチル)-6-メチル-4-(メチルチオ)ピリジン-2(1H)-オンの合成

テトラヒドロフラン(50mL)中の6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-カルボニトリル(3.6g、20mmol)の混合物を真空下で脱気し、窒素でパージした(3サイクル)。次いで、0℃のボランジメチルスルフィド錯体(10M、8.0mL、80mmol)をゆっくりと添加した後、反応混合物を70℃に温め、2時間攪拌した。0℃のメタノール(15mL)をゆっくりと添加して反応物をクエンチした後、混合物を減圧下で濃縮して、表題化合物(3.8g、粗製)を淡黄色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値185.1、実測値185.0。

10

【0068】

ステップ5：tert-ブチル((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)カルバメートの合成

テトラヒドロフラン(80mL)中の3-(アミノメチル)-6-メチル-4-(メチルチオ)ピリジン-2(1H)-オン(3.6g、20mmol)の溶液にトリエチルアミン(5.9g、8.1mL、59mmol)を添加した。混合物を30分間攪拌した後、二炭酸ジ-tert-ブチル(6.4g、29mmol)を添加し、反応物を25℃で12時間攪拌した。次いで反応混合物を減圧下で濃縮乾固させた後、水(35mL)を添加し、所望の生成物を石油エーテル/酢酸エチルの5：1混合物(30mL×3)で抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して、表題化合物(5.8g、粗製)を白色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値285.12、実測値284.9。¹H NMR(400MHz、ジメチルスルホキシド-d₆) δ 6.05(s、1H)、4.03-4.00(m、2H)、2.42(s、3H)、2.15(s、3H)、1.39(s、9H)。

20

【0069】

ステップ6：3-(アミノメチル)-6-メチル-4-(メチルチオ)ピリジン-2(1H)-オン(塩酸塩)の合成

25℃の1,4-ジオキサン中の塩化水素の溶液(4M、100mL、400mmol)に、tert-ブチル((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)カルバメート(5.0g、17.6mmol)を添加した。反応混合物を25℃で2時間攪拌し、次いで減圧下で濃縮乾固させた。残留物をジクロロメタン(30mL×2)および酢酸エチル(30mL)で洗浄して、表題化合物(4.5g、粗製、HCl塩)を黄色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値185.1、実測値185.0。¹H NMR(400MHz、D₂O) δ 6.31(s、1H)、4.03(s、2H)、2.41(s、3H)、2.18(s、3H)。

30

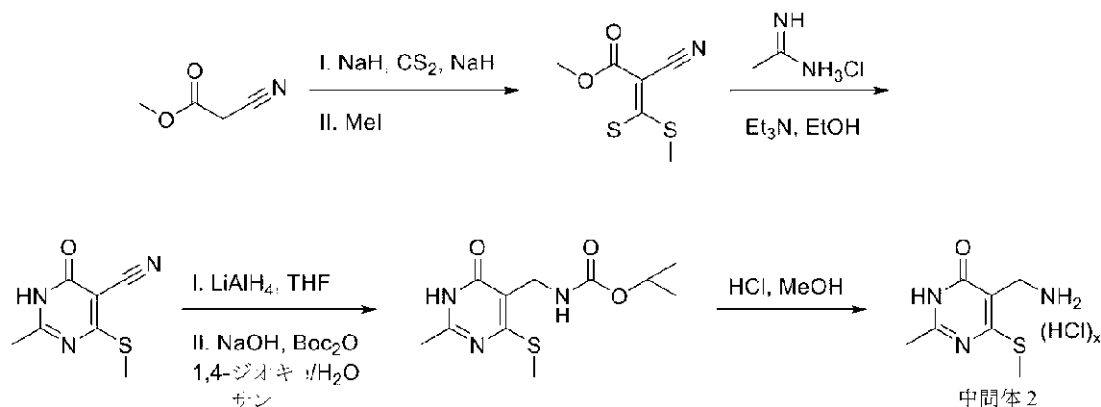
【0070】

中間体2：5-(アミノメチル)-2-メチル-6-(メチルチオ)ピリミジン-4(3H)-オン(塩酸塩)

40

50

【化 1 2】



10

ステップ 1：メチル 2-シアノ-3,3-ビス(メチルチオ)アクリレートの合成
 テトラヒドロフラン(400 mL)中の水素化ナトリウム(鉱油中60%分散)(4.23 g、106 mmol)の懸濁液を0℃に冷却した後、シアノ酢酸メチル(8.90 mL、101 mmol)を滴加した。反応混合物を15分間激しく攪拌した後、反応温度を20℃未満に保ちながら二硫化炭素(6.1 mL、101 mmol)を滴加した(白い半固体が黄色に変わった)。次にヨードメタン(15.7 mL、252 mmol)を滴加し、反応混合物を室温で15分間攪拌した。次いで反応物を減圧下で濃縮し、残留物を氷水に注いだ。得られた沈殿物を濾過し、真空下で乾燥させて、表題化合物(11.9 g、収率58%)を黄色/褐色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。¹H NMR(400 MHz、クロロホルム-d) δ 3.83(s、3H)、2.76(s、3H)、2.61(s、3H)。

20

【0071】

ステップ 2：2-メチル-4-(メチルチオ)-6-オキソ-1,6-ジヒドロピリミジン-5-カルボニトリルの合成

2-シアノ-3,3-ビス(メチルチオ)アクリル酸メチル(11.9 g、58.5 mmol)をエタノール(1000 mL)中に溶解させた。アセトアミジン塩酸塩(5.53 g、58.5 mmol)およびトリエチルアミン(36.7 mL、263 mmol)を混合物に添加し、一晩還流攪拌した。次いで、反応物を減圧下で濃縮し、残留物を10%の塩酸で洗浄した。沈殿物を濾過し、フィルターケーキを水およびジエチルエーテルで洗浄した後、真空下で乾燥させて、表題化合物(5 g、収率47%)を固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値182.03、実測値182.10。¹H NMR(400 MHz、ジメチルスルホキシド-d₆) δ 2.57(s、3H)、2.37(s、3H)。

30

【0072】

ステップ 3：tert-ブチル((2-メチル-4-(メチルチオ)-6-オキソ-1,6-ジヒドロピリミジン-5-イル)メチル)カルバメートの合成

0℃のテトラヒドロフラン(50 mL)中の2-メチル-4-(メチルチオ)-6-オキソ-1,6-ジヒドロピリミジン-5-カルボニトリル(1.5 g、8.27 mmol)の懸濁液に、テトラヒドロフラン中の水素化アルミニウムリチウムの溶液(2 M、6.2 mL、12.4 mmol)を添加した。反応物をゆっくりと室温に温め、完了したら、水酸化ナトリウムの水溶液(1 M、33 mL、33.1 mmol)でクエンチした。この混合物に、1,4-ジオキサン(50 mL)およびtert-ブチルジカーボネート(3.61 g、16.6 mmol)を順次添加した。アミンが完全に保護されるまで、二相混合物を激しく攪拌した。二相混合物を酢酸で中性pHに酸性化し、分離し、水層をジクロロメタンで抽出した。合わせた有機層を硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をジクロロメタンとともに粉碎し、濾液(所望の生成物を含む)を減圧下で濃縮乾固させた。得られた固体を、逆相フラッシュクロマトグラフ

40

50

イー（C18カラム、0.1%のトリフルオロ酢酸で緩衝した水中に5%~95%の勾配のアセトニトリル）によって、次いで順相フラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン中に30%~90%の勾配の酢酸エチル）によって精製して、表題化合物（2.57g、26%収率、>99%純度）を白色の固体として得た。LCMS [M - (C₄H₈) + H]⁺m/z: 計算値230.1、実測値230.0。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ 13.20 (s, 1H)、5.37 (t, J=5.5 Hz, 1H)、4.26 (d, J=5.6 Hz, 2H)、2.51 (s, 3H)、2.44 (s, 3H)、1.44 (s, 9H)。

【0073】

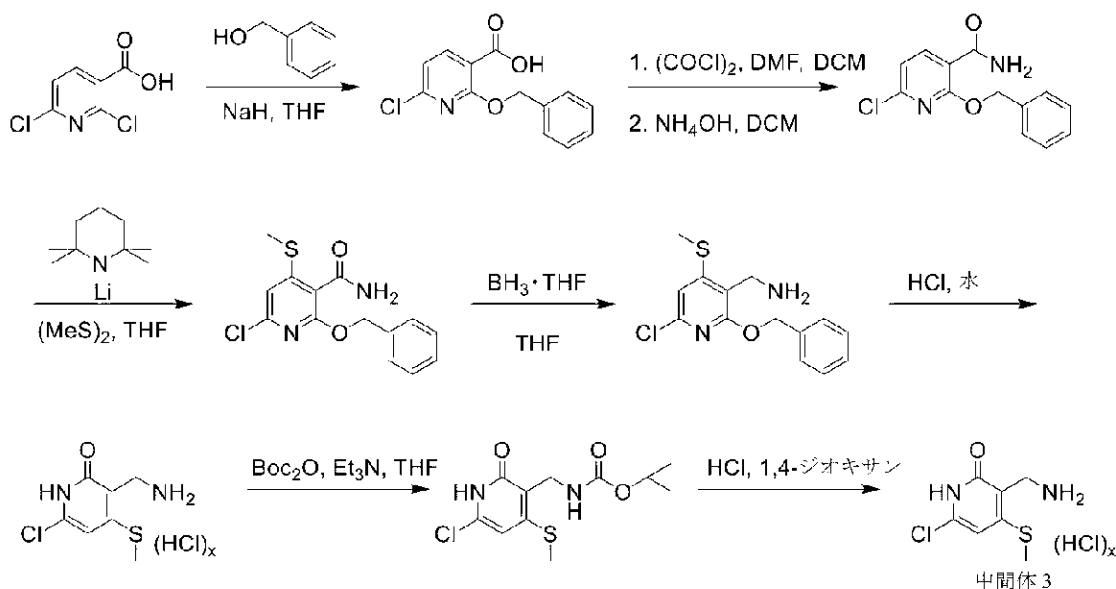
ステップ4. 5 - (アミノメチル) - 2 - メチル - 6 - (メチルチオ) ピリミジン - 4 (3H) - オン (塩酸塩) の合成

23°Cの1,4-ジオキサン (7.2 mL) 中のtert-ブチル ((2-メチル-4-(メチルチオ)-6-オキソ-1,6-ジヒドロピリミジン-5-イル)メチル)カルバメート (300 mg, 1.05 mmol) の懸濁液に、1,4-ジオキサン中の塩化水素の溶液 (4 M, 2.10 mL, 8.40 mmol) を添加した。反応物を23°Cで3時間攪拌し、次いで1,4-ジオキサン中の塩化水素の溶液 (4 M, 2.10 mL, 8.40 mmol) をさらに添加した。14時間後、次いで反応物を減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物 (254 mg, 収率94%) を白色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用了。LCMS [M + Na]⁺ (遊離塩基) m/z: 計算値208.1、実測値208.1。

【0074】

中間体3: 3 - (アミノメチル) - 6 - クロロ - 4 - (メチルチオ) ピリジン - 2 (1H) - オン (塩酸塩)

【化13】



ステップ1: 2 - (ベンジルオキシ) - 6 - クロロニコチン酸の合成

テトラヒドロフラン (500 mL) 中の水素化ナトリウム (鉱油中60%分散) (11.5 g, 286 mmol) の懸濁液に、0°Cのベンジルアルコール (14 mL, 143 mmol) を添加した。反応混合物を20分間攪拌し、次いでテトラヒドロフラン (500 mL) 中の2,6-ジクロロピリジン-3-カルボン酸 (25 g, 130 mmol) の溶液を添加し、反応混合物を23°Cで4時間攪拌した。次いで反応物を10%の塩酸 (300 mL) でクエンチし、pH~8まで固体のNaHCO₃で処理し、酢酸 (水中50%) で酸性化し、最後に酢酸エチル (200 mL x 3) で抽出した。合わせた有機層をブライン (200 mL) で洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、濃縮乾固させた。

残留物をフラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン中5%～50%の勾配の酢酸エチル）によって精製して、標題化合物（33.68 g、収率98%）を得た。

【0075】

ステップ2：2-（ベンジルオキシ）-6-クロロニコチンアミドの合成

0℃のジクロロメタン（500 mL）中の2-（ベンジルオキシ）-6-クロロニコチン酸（33.68 g、128.2 mmol）の溶液に、N,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）、続いて塩化オキサリル（11.9 mL、141 mmol）を添加した。反応物を23℃で2時間攪拌し、次いで濃縮乾固させた。残留物をジクロロメタン（200 mL）中に溶解させ、0℃の水酸化アンモニウムの濃縮溶液（50 mL）にゆっくりと添加した。1時間後、有機層を収集し、水相をジクロロメタン（50 mL×3）で抽出した。合わせた有機層を硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン中0%～50%の勾配の酢酸エチル）によって精製して、標題化合物（定量収率）を固体として得た。

【0076】

ステップ3：2-（ベンジルオキシ）-6-クロロ-4-（メチルチオ）ニコチンアミドの合成

-78℃のテトラヒドロフラン（300 mL）中の2,2,6,6-テトラメチルピペリジン（29.45 mL、175.1 mmol）の溶液に、ヘキサン中のn-ブチルリチウムの溶液（2.5 M、70 mL、175.1 mmol）を添加した。反応混合物を0℃に30分間温め、次いで-78℃に冷却して戻した。次いで内部温度を-60℃未満に保ちながら、テトラヒドロフラン（100 mL）中の2-（ベンジルオキシ）-6-クロロニコチンアミド（11.5 g、43.8 mmol）の溶液を添加した。反応混合物を-78℃で1時間攪拌し、次いでジメチルジスルフィド（15.77 mL、175.1 mmol）を添加した。反応を-78℃でさらに2時間攪拌し、次いで-78℃の酢酸水溶液（50% v/v）でクエンチした。所望の生成物を酢酸エチル（100 mL×3）で抽出し、合わせた有機層を水（20 mL）、炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液（20 mL）、ブライン（20 mL）で洗浄し、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン中0%～20%の勾配の酢酸エチル）によって精製して、標題化合物（4.86 g、収率36%）を得た。

【0077】

ステップ4：（2-（ベンジルオキシ）-6-クロロ-4-（メチルチオ）ピリジン-3-イル）メタンアミンの合成

23℃のテトラヒドロフラン（100 mL）中の2-（ベンジルオキシ）-6-クロロ-4-（メチルチオ）ニコチンアミド（4.86 g、15.7 mmol）の溶液に、テトラヒドロフラン中のボランの溶液（1 M、63 mL、63 mmol）を添加した。反応混合物を還流で15時間攪拌し、次いで室温のメタノールをゆっくりと添加することによってクエンチした。反応混合物を減圧下で濃縮乾固させ、残留物をフラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、ジクロロメタン中0%～30%の勾配のメタノール）によって精製して、表題化合物（710 mg、収率15%）を白色の固体として得た。

【0078】

ステップ5：3-（アミノメチル）-6-クロロ-4-（メチルチオ）ピリジン-2（1H）-オン（塩酸塩）の合成

（2-（ベンジルオキシ）-6-クロロ-4-（メチルチオ）ピリジン-3-イル）メタンアミン（710 mg、2.41 mmol）を収容するフラスコに、濃塩酸（12 M、5.0 mL、60 mmol）を添加した。反応混合物を23℃で2時間攪拌し、次いで減圧下で濃縮乾固させた。残留物をメタノールとジエチルエーテルとの混合物から再結晶させて、表題化合物（400 mg、69%収率）を白色の固体として得た。

【0079】

ステップ6：tert-ブチル（（6-クロロ-4-（メチルチオ）-2-オキソ-1

10

20

30

40

50

、2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)カルバメートの合成

ジクロロメタン(50 mL)中の3-(アミノメチル)-6-クロロ-4-(メチルチオ)ピリジン-2(1H)-オン塩酸塩(1.575 g、6.53 mmol)の懸濁液に、室温のジ-tert-ブチルジカーボネート(2.85 g、13.1 mmol)、続いてN,N-ジイソプロピルエチルアミン(3.4 mL、19.6 mmol)を添加した。

(すべてが溶解するまで)反応物を室温で3時間攪拌し、次いで水でクエンチした。有機層を分離し、硫酸マグネシウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、ジクロロメタン中0~10%の勾配のメタノール)によって精製して、標題化合物(1.5 g、収率75%)を白色の固体として得た。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値305.1、実測値305.1。

[0080]

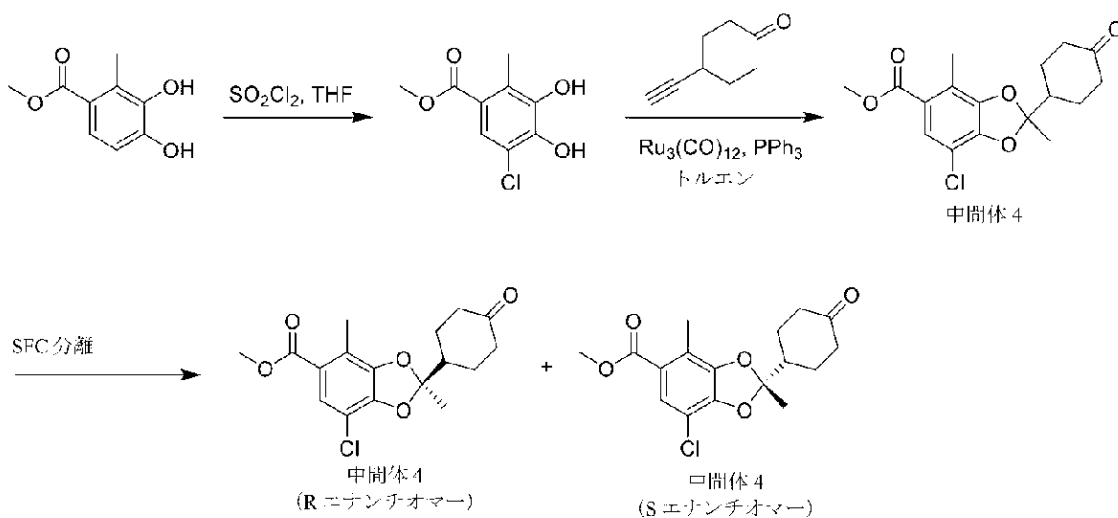
ステップ7: 3-(アミノメチル)-6-クロロ-4-(メチルチオ)ピリジン-2(1H)-オン(塩酸塩)の合成

1,4-ジオキサン(4.9 mL)中のtert-ブチル((6-クロロ-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)カルバメート(300 mg、984 μmol)の懸濁液に、室温の1,4-ジオキサン中の塩化水素の溶液(4 M、1.96 mL、7.87 mmol)を添加した。反応物を室温で3時間攪拌し、次いで1,4-ジオキサン中の塩化水素の溶液(4 M、1.96 mL、7.87 mmol)をさらに添加した。14時間後、反応物を減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物(253 mg、定量収率)を白色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+Na]⁺(遊離塩基)m/z: 計算値227.0、実測値227.0。

[0081]

中間体4: 7-クロロ-2,4-ジメチル-2-(4-オキソシクロヘキシル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボン酸メチル

[化14]



ステップ1: 5-クロロ-3,4-ジヒドロキシ-2-メチル安息香酸メチルの合成
-20℃のテトラヒドロフラン(199 mL)中の3,4-ジヒドロキシ-2-メチル安息香酸メチル(5.11 g、27.9 mmol)の溶液に、塩化スルフィル(2.45 mL、30.6 mmol)を滴加した。反応混合物を-20℃で3時間攪拌し、次いで塩化アンモニウムの飽和水溶液(50 mL)でクエンチした。所望の生成物を酢酸エチル(25 mL×3)で抽出した。合わせた有機層をブライン(25 mL)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘプタン中0%~60%の勾配の酢酸エチル)によって精製して、標題化合物(4.117 g、収率68%)をベージュの固体として得た。LCMS [M

+H] ⁺m/z : 計算値 217.0、実測値 217.1 (C L 同位体パターン)。

【0082】

ステップ2: 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(4-オキシシクロヘキシル)-2H-1, 3-ベンゾジオキソール-5-カルボン酸メチルの合成

5-クロロ-3, 4-ジヒドロキシ-2-メチル安息香酸メチル (1.2 g、5.53 mmol)、トリルテニウムドデカカルボニル (176 mg、276 μmol)、およびトリフェニルホスフィン (145 mg、553 μmol) の混合物を真空下で脱気し、窒素でパージした (3 サイクル)。トルエン (8.1 mL) を添加し、反応混合物を30分間加熱還流した。次いで、トルエン (17 mL) 中の4-エチニルシクロヘキサノール-1-オン (1.34 g、11.0 mmol) の溶液を滴加し、反応物を23時間還流で撹拌した。最後に、反応混合物を室温に冷却し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中0~60%の勾配の酢酸エチル) によって精製して、標題化合物 (1.327 g、収率70%) を黄色の油として得た。LCMS [M+Na] ⁺m/z : 計算値 361.1、実測値 361.1 (C L 同位体パターン)。

【0083】

ステップ3: (R)-7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(4-オキシシクロヘキシル)ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボン酸メチルと、(S)-7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(4-オキシシクロヘキシル)ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボン酸メチルとの分離

メチル-7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(4-オキシシクロヘキシル)ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボキシレート (4.4 g、13 mmol) のラセミ混合物を、分取SFC [カラム: Daicel chemical industriesからのChiral Pak AY (内径250mm×50mm、10 μm)。移動相A: CO₂/移動相B: メタノール中0.1%のNH₄OH。無勾配 (移動相A 85%および移動相B 15%)。流量: 80 mL/分。カラム温度: 40℃] によって分離した。中間体4 (ピーク1) (不要なエナンチオマー/ジストマー): 保持時間=6.2分。回収=1.4 g、4.05 mmol、収率31%、90% ee、純度98% (黄色の固体)。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ 7.48 (s、1H)、3.78 (s、3H)、2.44-2.36 (m、2H)、2.35-2.25 (m、6H)、2.19 (tdd、J=2.8、5.6、13.1 Hz、2H)、1.70-1.57 (m、5H)。中間体4 (ピーク2) (所望のエナンチオマー/ユートマー): 保持時間=7.0分。回収=1.1 g、3.08 mmol、収率23.75%、99% ee、純度95% (黄色の固体)。¹H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ 7.49 (s、1H)、3.78 (s、3H)、2.44-2.36 (m、2H)、2.36-2.25 (m、6H)、2.20 (tdd、J=2.8、5.6、13.1 Hz、2H)、1.72-1.59 (m、5H)。SFC分析方法: [カラム: Chiral Pak AY-3 (内径150×4.6 mm、3 μm)。移動相A: CO₂/移動相B: iPrOH中0.05%のEt₂NH。勾配: 移動相B 5~40% (5.5分以上)。流量: 2.5 mL/分。カラム温度: 40℃]。中間体4 (ピーク1-不要なエナンチオマー/ジストマー): 保持時間=2.853分。中間体4 (ピーク2-所望のエナンチオマー/ユートマー): 保持時間=2.979分。

【0084】

中間体5: 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(トランス-4-((3-(トリフルオロメチル)オキセタン-3-イル)アミノ)シクロヘキシル)ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル

10

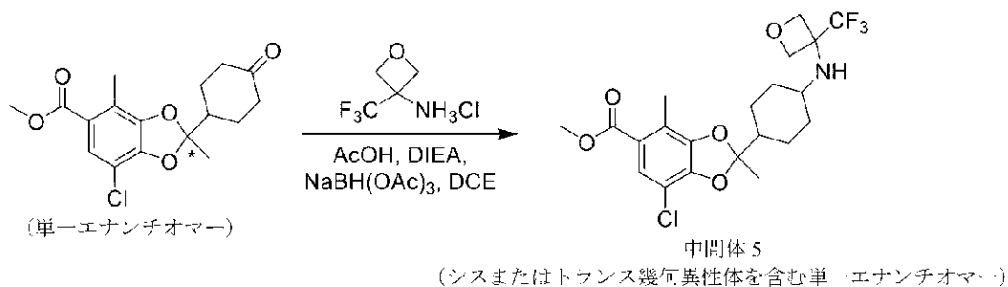
20

30

40

50

【化 15】



ジクロロエタン (9.54 mL) 中の 1-クロロ-N-[3-(トリフルオロメチル)オキセタン-3-イル] 水素アミン (678 mg、3.82 mmol) と N,N-ジイソプロピルエチルアミン (698 μ L、4.01 mmol) との混合物を室温で 30 分間攪拌した後、酢酸 (218 μ L、3.82 mmol)、続いてメチル-7-クロロ-2,4-ジメチル-2-(4-オキソシクロヘキシル) ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボキシレート (650 mg、1.91 mmol) をこの反応混合物に添加した。室温で 5 分後、混合物は透明 (黄色/褐色) になり、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (404 mg、1.91 mmol) を添加した。反応物を室温で 3 時間攪拌し、次いで炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液 (30 mL) でクエンチした。所望の生成物をジクロロメタン (30 mL $\times$ 3) で抽出し、合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物を、逆相フラッシュクロマトグラフィー (C18 カラム、0.1% のトリフルオロ酢酸とともにアセトニトリル/水 1:1) によって精製して、2 つの幾何異性体 (シスおよびトランス) を得た。最初に溶出するピークは、幾何異性体 1 に対応する。

【0085】

分析 LCMS 方法 (幾何異性体用)

[カラム: Zorbax SB-C8 (内径 7.5 $\times$ 4.6 mm、3.5 μ m)。移動相 A: アセトニトリル中 0.1% のトリフルオロ酢酸/移動相 B: 水中のトリフルオロ酢酸。勾配: 移動相 B の 5~100% (3.0 分以上)、続いて移動相 B の 100% (4.5 分)。流量: 1.5 mL/分。カラム温度: 20 $^{\circ}$ C。] 幾何異性体 1 (所望): 保持時間 = 4.073 分 (278 mg、31%)。幾何異性体 2 (不要): 保持時間 = 4.277 分 (253 mg、29%)。

【0086】

幾何異性体 1 のエナンチオマー (LCMS 方法に基づいて所望) を分取 SFC [カラム: Chiralcel OX-H (内径 250 $\times$ 21 mm) によって分離した。移動相 A: CO₂/移動相 B: 1:1 のイソプロパノール/ヘキサン混合物中 0.25% のイソプロピルアミン。無勾配 (移動相 A 85% および移動相 B 15%)。流量: 80 g/分。カラム温度: 25 $^{\circ}$ C]。中間体 5 (ピーク 1): 保持時間 = 1.84 分。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 464.15、実測値 464。中間体 5 (ピーク 2): 保持時間 = 2.1 分。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 464.15、実測値 464.2。

【0087】

中間体 6: 3-(アミノメチル)-4-クロロ-6-メチルピリジン-2(1H)-オン

10

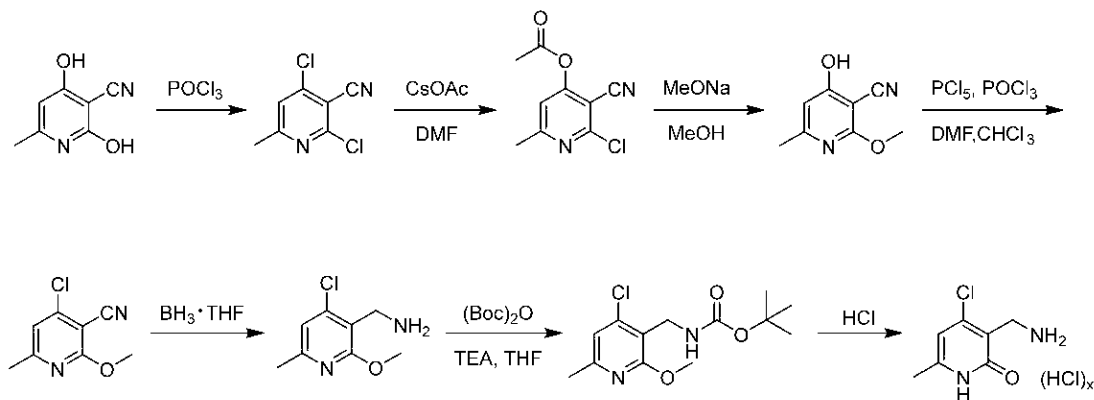
20

30

40

50

【化 16】



ステップ 1：2，4-ジクロロ-6-メチルニコチノニトリルの合成

オキシ塩化リン（150 mL）中の2，4-ジヒドロキシ-6-メチルニコチノニトリル（80 g、533.3 mmol）の溶液を120℃で2時間攪拌し、次いで炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液（pH=8まで）でクエンチした。それを水（2000 mL）と酢酸エチル（1000 mL）とに分配し、有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物（85 g、収率86%）を褐色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値186.98、実測値186.6。

【0088】

ステップ 2：2-クロロ-4-ヒドロキシ-6-メチルニコチノニトリルの合成

N，N-ジメチルホルムアミド（50 mL）中の2，4-ジクロロ-6-メチルニコチノニトリル（10 g、53 mmol）の溶液に、室温の酢酸セシウム（30.8 g、160 mmol）を添加した。反応物を80℃で一晩攪拌し、次いで水（800 mL）でクエンチした。所望の生成物を酢酸エチル（800 mL）で抽出し、有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。標題化合物（8.8 g、収率98%）を褐色の固体として得、さらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値169.01、実測値168.8。

【0089】

ステップ 3：4-ヒドロキシ-2-メトキシ-6-メチルニコチノニトリルの合成

メタノール（50 mL）中の2-クロロ-4-ヒドロキシ-6-メチルニコチノニトリル（8.8 g、52.2 mmol）とナトリウムメトキシド（14.1 g、261 mmol）との混合物を60℃で一晩攪拌した。pH=5になるまで、混合物を塩酸の1 M溶液でクエンチした。それを水（500 mL）と酢酸エチル（500 mL）とに分配し、有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮して、表題化合物（8.0 g、収率93%）を褐色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値165.1、実測値164.8。

【0090】

ステップ 4：4-クロロ-2-メトキシ-6-メチルニコチノニトリル

クロロホルム（100 mL）中の4-ヒドロキシ-2-メトキシ-6-メチルニコチノニトリル（8.0 g、48.7 mmol）、五塩化リン（20.3 g、97.5 mmol）、オキシ塩化リン（14.9 g、9.09 mmol、97.5 mmol）、およびN，N-ジメチルホルムアミド（5 mL）の混合物を60℃で30分間攪拌した。反応物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液でクエンチした（pH=8まで）。それを水（1000 mL）と酢酸エチル（1000 mL）とに分配し、有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濃縮乾固させて、表題化合物（8.0 g、収率90%）を褐色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで直接使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値183.0、実測値182.8。

【0091】

ステップ5：（4-クロロ-2-メトキシ-6-メチルピリジン-3-イル）メタンアミンの合成

テトラヒドロフラン（50 mL）中の4-クロロ-2-メトキシ-6-メチルニコチンニトリル（8.0 g、43.8 mmol）の溶液に、ボランジメチルスルフィド錯体（10 M、5.3 mL、53 mmol）を添加した。混合物を60℃で2時間攪拌し、次いで0℃のメタノール（10 mL）でクエンチした。混合物を減圧下で濃縮乾固させて、表題（7.0 g、収率93%）を褐色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで直接使用した。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値187.1、実測値187.1。

10

【0092】

ステップ6：tert-ブチル（（4-クロロ-2-メトキシ-6-メチルピリジン-3-イル）メチル）カルバメート

テトラヒドロフラン（50 mL）中の（4-クロロ-2-メトキシ-6-メチルピリジン-3-イル）メタンアミン（7.0 g、37.5 mmol）、ジ-tert-ブチルジカーボネート（15.2 g、75.0 mmol）、およびトリエチルアミン（11.4 g、15.7 mL、113 mmol）の混合物を20℃で16時間攪拌し、次いで水（500 mL）でクエンチした。所望の生成物を酢酸エチル（500 mL）で抽出し、有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュカラム（シリカゲルカラム、石油エーテル：酢酸エチル40：1）によって精製して、標記化合物（3.0 g、28%収率）を無色の油として得た。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値287.1、実測値286.9。

20

【0093】

ステップ7：3-（アミノメチル）-4-クロロ-6-メチルピリジン-2（1H）-オン

水中の塩化水素の溶液（4 M、10 mL、10 mmol）に、室温のtert-ブチル（（4-クロロ-2-メトキシ-6-メチルピリジン-3-イル）メチル）カルバメート（3.0 g、10.5 mmol）を添加した。反応物を100℃で2時間加熱し、次いで減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物（1.7 g、94%収率）を黄色の固体として得た。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値173.04、実測値173.1。¹H NMR（400 MHz、メタノール-d₄）：δ 6.38（s、1H）、4.15（s、2H）、2.32（s、3H）。

30

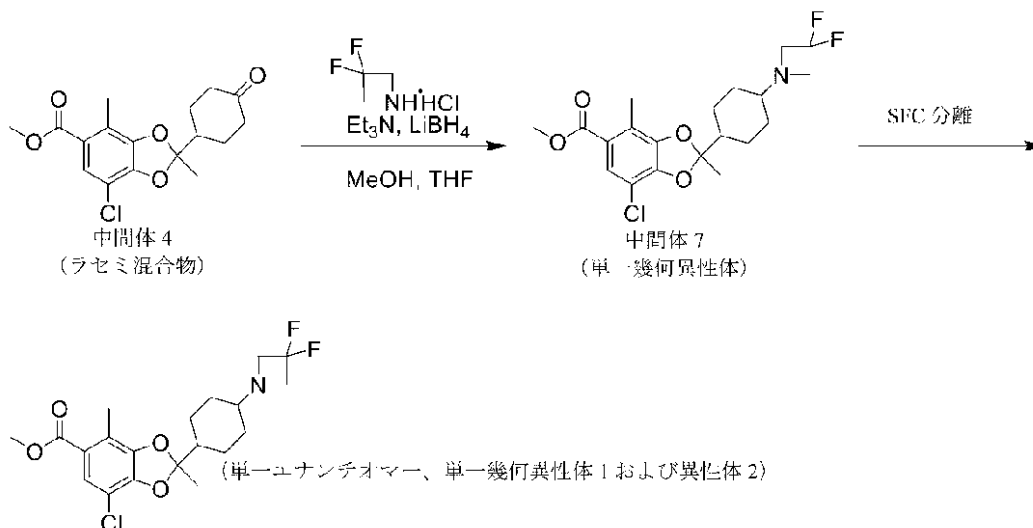
【0094】

中間体7：7-クロロ-2-（4-（3，3-ジフルオロアゼチジン-1-イル）シクロヘキシル）-2，4-ジメチルベンゾ[d][1，3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル

40

50

【化 17】



ステップ 1：7-クロロ-2-(4-(3,3-ジフルオロアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチルの合成

メタノール (5 mL) およびテトラヒドロフラン (5 mL) 中の 7-クロロ-2,4-ジメチル-2-(4-オキシシクロヘキシル)ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル (中間体 4-ラセミ混合物) 550 mg、1.62 mmol)、3,3-ジフルオロアゼチジン塩酸塩 (839 mg、6.48 mmol)、およびトリエチルアミン (895 μ L、6.64 mmol) の溶液を室温で一晩攪拌した。翌日、反応物を -78℃ に冷却し、水素化ホウ素リチウムの溶液 (テトラヒドロフラン中 2 M、1.21 mL、2.43 mmol) を滴加した。濃い黄色の混合物を徐々に室温に温め、次いで 0℃ の炭酸ナトリウムの飽和水溶液でクエンチした。所望の生成物をジクロロメタンで抽出し (3 回)、合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル KP-NH カラム、ヘプタン中 0~20% の勾配の酢酸エチル) によって 2 回精製して、標題化合物 (354 mg、53% 収率) を単一幾何異性体 (cis またはトランス) のラセミ混合物として得た。LCMS [M+H]⁺ m/z: 計算値 416.9、実測値 416.2。

【0095】

ステップ 2：(2R)-7-クロロ-2-(4-(3,3-ジフルオロアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチルと (2S)-7-クロロ-2-(4-(3,3-ジフルオロアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチルの分離

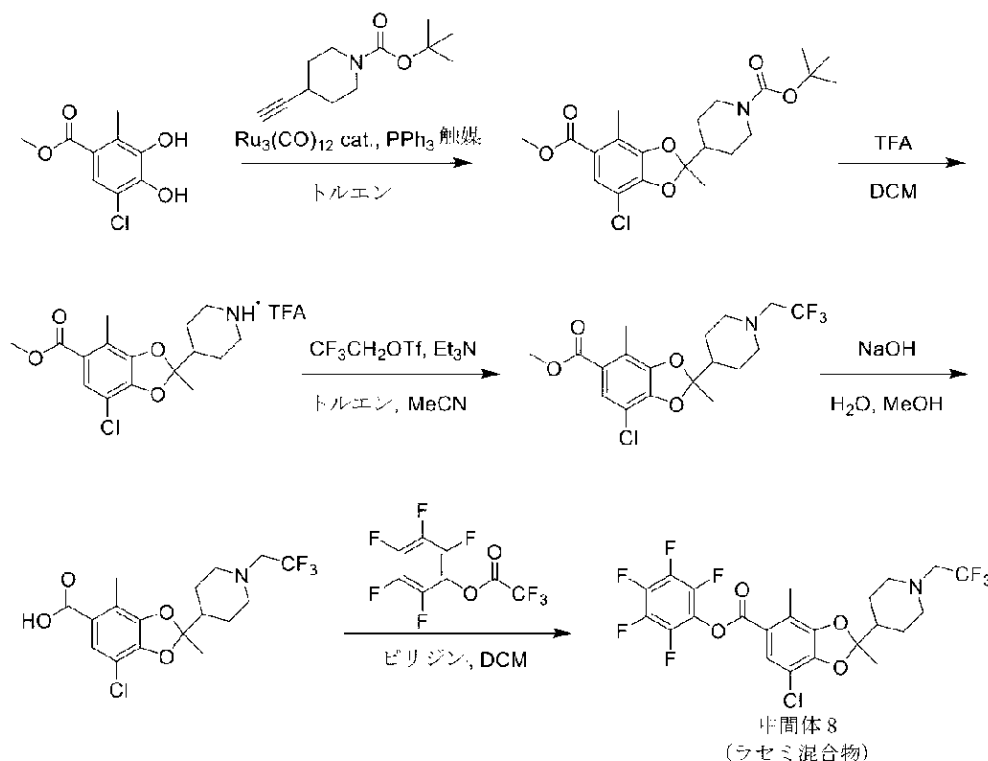
7-クロロ-2-(4-(3,3-ジフルオロアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル (560 mg) のラセミ混合物を分取 SFC [カラム: Daicel chemical industries からの Chiralpak AD-H。移動相 A: CO₂/移動相 B: ヘキサンおよびエタノール (1:1) の混合物中 0.25% のイソプロピルアミン。無勾配 (移動相 A 90% および移動相 B 10%)。流量: 80 g/分。カラム温度: 25℃] によって分離した。SFC 分析方法: カラム: Daicel chemical industries からの Chiralpak AD-H (100 mm × 4.6 mm。移動相 A: CO₂/移動相 B: ヘキサンとエタノールとの混合物中 (3:1) 0.1% のイソプロピルアミン。無勾配 (移動相 A の 85% および移動相 B の 15%)。流量: 4 mL/分。カラム温度: 40℃。中間体 7 (ピーク 1): 保持時間 = 1.02 分 (SFC 分析方法)。回収 = 173 mg、収率 15%、96% ee。¹H NMR (400 MHz、クロロホル

μ-d) δ 7.48 (s, 1H)、3.78 (s, 3H)、2.44-2.36 (m, 2H)、2.35-2.25 (m, 6H)、2.19 (tdd, J=2.8、5.6、13.1 Hz, 2H)、1.70-1.57 (m, 5H)。中間体7 (ピーク2) : 保持時間=1.16分 (SFC分析方法)。回収=150mg、収率13%、97% ee。LCMS [M+H]⁺m/z : 計算値416.86、実測値416.2。

【0096】

中間体8 : ペルフルオロフェニル7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(1-(2, 2, 2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボキシレート

【化18】



ステップ1 : tert-ブチル4-(7-クロロ-5-(メトキシカルボニル)-2, 4-ジメチルベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-2-イル)ピペリジン-1-カルボキシレートの合成

凝縮器を備えた100mLナシフラスコ内で、5-クロロ-3, 4-ジヒドロキシ-2-メチル安息香酸メチル (1.219g、5.58mmol)、トリフェニルホスフィン (146mg、0.558mmol)、およびトリルテニウムドデカカルボニル (178mg、0.279mmol) の混合物を、窒素/真空サイクル (4サイクル) でパージし、次いでトルエン (12mL) を添加し、窒素/真空サイクルでパージし、次いで120℃で30分間攪拌した。トルエン (10mL) 中のtert-ブチル4-エチニルピペリジン-1-カルボキシレート (2.32g、11.1mmol) の混合物を暗色の混合物に添加した。得られたオレンジ色の溶液を120℃でさらに2時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、次いでフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中0~100%の勾配の酢酸エチル) によって精製して、表題化合物 (2.33g、98%) を黄色の油として得た。LCMS [M+Na]⁺m/z : 計算値448.2、実測値448.2。

【0097】

ステップ2 : 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル (トリフルオロ酢酸塩) の合成

ジクロロメタン (2mL) 中のtert-ブチル4-[7-クロロ-5-(メトキシカルボニル)-2, 4-ジメチルベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-2-イル]ピペリジン-1-カルボキシレートの合成

10

20

30

40

50

ルボニル) - 2, 4-ジメチル-2H-1, 3-ベンゾジオキサール-2-イル] ピペリジン-1-カルボキシレート (2.33 g、5.47 mmol) の黄色の溶液に、TFA (1 mL) を添加した。30分後、反応混合物を減圧下で濃縮して、表題化合物 (2.40 g、定量的) をガムとして得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 326.79、実測値 326.2。

【0098】

ステップ3: 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(1-(2, 2, 2-トリフルオロエチル) ピペリジン-4-イル) ベンゾ [d] [1, 3] ジオキサール-5-カルボン酸メチルの合成

トルエン (20 mL) およびアセトニトリル (10 mL) 中の7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(ピペリジン-4-イル) -2H-1, 3-ベンゾジオキサール-5-カルボン酸メチル、トリフルオロ酢酸塩 (2.40 g、5.45 mmol) の溶液に、トリエチルアミン (8 mL、57.6 mmol) および2, 2, 2-トリフルオロエチルトリフルオロメタンスルホネート (3.0 g、12.9 mmol) を添加した。3時間後、反応混合物を減圧下で濃縮した。水 (50 mL) を添加し、混合物をEtOAc (30 mL x 3) で抽出した。合わせた有機層をブライン (50 mL x 2) で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮し、次いでフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ヘプタン中0~50%の勾配の酢酸エチル) によって精製して、表題化合物 (2.04 g、92%) を黄色がかった油として得た。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 408.81、実測値 408.2。

【0099】

ステップ4: 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(1-(2, 2, 2-トリフルオロエチル) ピペリジン-4-イル) ベンゾ [d] [1, 3] ジオキサール-5-カルボン酸の合成

メタノール (3 mL) 中の7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-[1-(2, 2, 2-トリフルオロエチル) ピペリジン-4-イル] -2H-1, 3-ベンゾジオキサール-5-カルボン酸メチル (691 mg、1.69 mmol) の溶液に、水中6Mの水酸化ナトリウム (1 mL、6.00 mmol) を添加し、60℃で加熱した。25分後、反応混合物を減圧下で濃縮して、ほとんどのメタノールを除去した。次いで混合物を水で希釈し、0℃に冷却し、次いで1Mの塩酸でpH=7に中和した。混合物をジクロロメタンで抽出し (3回)、合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して、表題化合物を白色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 394.79、実測値 394.2。

【0100】

ステップ5: ペルフルオロフェニル7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-(1-(2, 2, 2-トリフルオロエチル) ピペリジン-4-イル) ベンゾ [d] [1, 3] ジオキサール-5-カルボキシレートの合成

ジクロロメタン (5 mL) 中の7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-[1-(2, 2, 2-トリフルオロエチル) ピペリジン-4-イル] -2H-1, 3-ベンゾジオキサール-5-カルボン酸 (665 mg、1.68 mmol) の攪拌した溶液に、ピリジン (1 mL、12.4 mmol) を添加し、続いて2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル2, 2, 2-トリフルオロアセテート (500 μL、2.90 mmol) を添加した。20分後、反応混合物を減圧下で濃縮して、表題化合物を得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 560.84、実測値 560.2。

【0101】

中間体9: 7-クロロ-2-(4-(3-(メトキシアゼチジン-1-イル) シクロヘキシル) -2, 4-ジメチルベンゾ [d] [1, 3] ジオキサール-5-カルボン酸

10

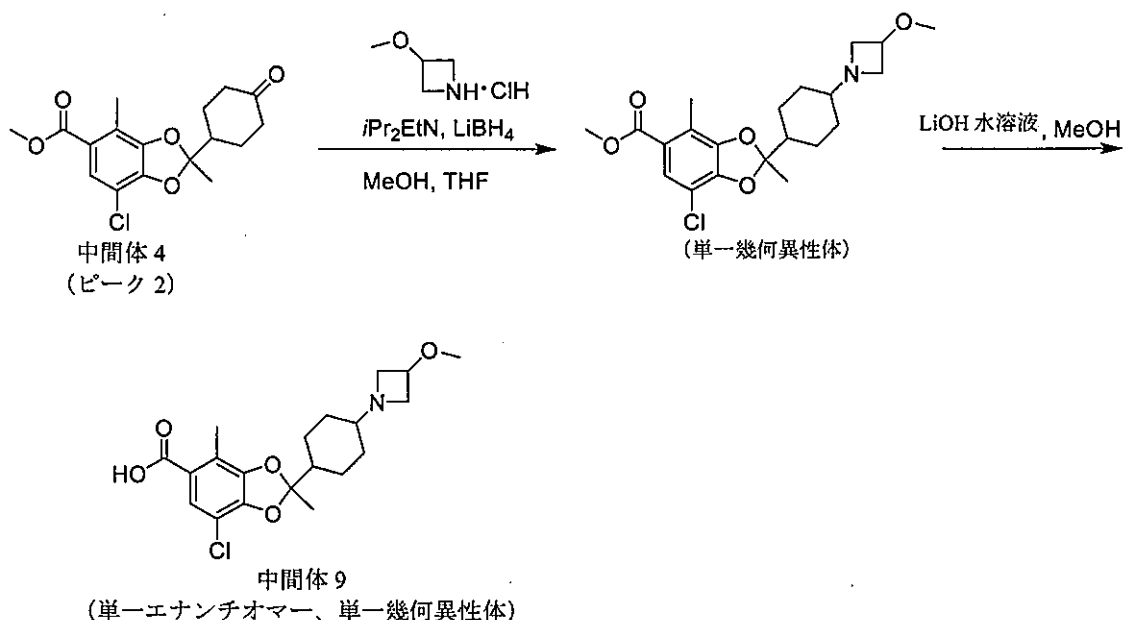
20

30

40

50

【化 19】



ステップ 1：7-クロロ-2-(4-(3-(メトキシアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチルの合成

メタノール (30 mL) 中の 3-メトキシアゼチジン塩酸塩 (8 g、64.75 mmol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (12 mL、68.9 mmol) の溶液を室温で 30 分間攪拌した後、テトラヒドロフラン (30 mL) 中の 7-クロロ-2,4-ジメチル-2-(4-オキソシクロヘキシル)-1,3-ベンゾジオキソール-5-カルボン酸メチル (中間体 4-ピーク 2) (4.1 g、12.10 mmol) の別の溶液の溶液を添加した。反応混合物を室温で 1 時間攪拌し、次いで -70℃ に冷却した。水素化ホウ素リチウム (500 mg、22.96 mmol) を添加し、反応物を -70℃ で 30 分間 [または出発物質の完全な消費が TLC、酢酸エチル/メタノール 5:1 によって観察されるまで] 攪拌した。次に、反応物の 2 つのバッチを合わせ、0℃ の塩化アンモニウムの飽和水溶液 (120 mL) でクエンチし、所望の生成物をジクロロメタン (200 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー (シリカゲル、ジクロロメタン中 0~14% の勾配のメタノール) によって精製して、表題化合物 (8.05 g、67% 収率、83% 純度) を淡黄色の油として得た。分取薄層クロマトグラフィー (シリカゲル、酢酸エチル:メタノール 15:1) によって、試料 (50 mg) をさらに精製した。LCMS [M+H]⁺ m/z: 計算値 410.2、実測値 410.1。¹H NMR (400 MHz、メタノール-d₄) δ 7.39 (s、1H)、3.95-3.91 (m、1H)、3.73 (s、3H)、3.59-3.51 (m、2H)、3.16 (s、3H)、2.97 (br dd、J=6.4、8.0 Hz、2H)、2.26 (s、3H)、2.11-2.02 (m、1H)、1.91-1.73 (m、5H)、1.54 (s、3H)、1.22-1.12 (m、2H)、0.98-0.86 (m、2H)。

【0102】

ステップ 2：7-クロロ-2-(4-(3-(メトキシアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸の合成

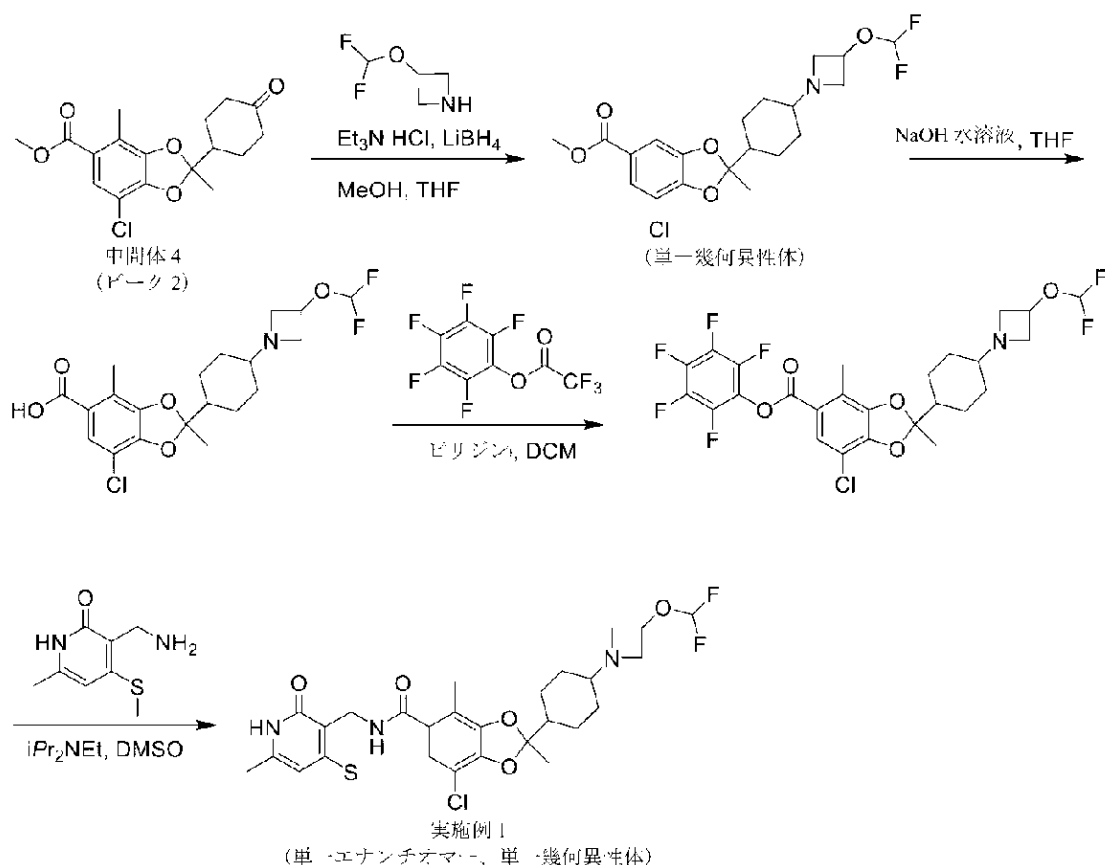
メタノール (48 mL) 中の 7-クロロ-2-(4-(3-(メトキシアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル (4 g、9.75 mmol) の溶液に、水 (12 mL) 中の水酸化リチウム水和物 (4.03 g、96.06 mmol) の溶液を添加した。反応物を 70℃ で 2

時間攪拌し、次いで2つのバッチを合わせ、減圧下で濃縮した。水(50 mL)を添加し、0℃のクエン酸の飽和水溶液でpHを6に調整した。所望の生成物を、ジクロロメタンとイソプロパノールとの3:1混合物(300 mL×5)で抽出した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物(6.1 g、粗製)をオフホワイトの固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用了。LCMS $[M+H]^+ m/z$: 計算値396.2、実測値396.1。 ^1H NMR (400 MHz、メタノール- d_4) δ 7.07 (s、1H)、4.05–4.10 (m、2H)、3.76–3.88 (m、1H)、3.67 (br dd、 $J=10$ 、3.6 Hz、2H)、3.22 (s、3H)、2.71–2.81 (m、1H)、2.19 (s、3H)、1.91–1.99 (m、4H)、1.75–1.85 (m、1H)、1.52 (s、3H)、1.18–1.28 (m、2H)、1.06–1.14 (m、2H)。

【0103】

実施例#1: 7-クロロ-2-(4-(3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチル-N-(6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボキサミド

【化20】



ステップ1: 7-クロロ-2-(4-(3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチルの合成

メタノール(2 mL)とテトラヒドロフラン(2 mL)との混合物中の、7-クロロ-2,4-ジメチル-2-(4-オキソシクロヘキシル)ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル(中間体4-ピーク2)(224 mg、0.661 mmol)、3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン(336 mg、2.72 mmol)、およびトリエチルアミン塩酸塩(373 mg、2.71 mmol)の溶液を、室温で1.5時間

攪拌し、次いで -78°C に冷却した。 -78°C のテトラヒドロフラン中の水素化ホウ素リチウム溶液(2 M、500 μL 、1 mmol)を滴加した後、反応物を室温まで15分間温めた。次に、混合物を 0°C に冷却し、次いで炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液でクエンチし、ジクロロメタンで希釈し、室温に温めた。所望の生成物をジクロロメタンで水層から抽出し(3回)、疎水性フィルターを使用して合わせた有機層を乾燥させ、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー(シリカゲル、ヘプタン中10~100%の勾配の酢酸エチル、次いで酢酸エチル中0~100%の勾配のエタノール)によって精製して、標題化合物(205 mg、収率70%)の単一幾何異性体(シスまたはトランス)を得た。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値445.9、実測値446.2。
【0104】

10

ステップ2: 7-クロロ-2-(4-(3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸の合成

メタノール(3 mL)中の7-クロロ-2-(4-(3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル(205 mg、0.460 mmol)の溶液に、水酸化ナトリウムの水溶液(6 M、1 mL、6.00 mmol)を添加した。反応物を 60°C で20分間加熱し、次いで水で希釈し、 0°C に冷却し、1 Mの塩酸でpH=2に酸性化し、次いで1 Mの水酸化ナトリウム水溶液でpH=7に中和した。所望の生成物をジクロロメタンで抽出し(3回)、疎水性フィルターを使用して乾燥させ、減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物(176 mg、89%収率)を白色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値431.9、実測値432.2。

20

【0105】

ステップ3: ペルフルオロフェニル7-クロロ-2-(4-(3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボキシレートの合成

ジクロロメタン(0.5 mL)中の7-クロロ-2-(4-(3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボン酸(176 mg、0.408 mmol)の溶液に、室温のピリジン(1.0 mL、12.4 mmol)を添加し、続いて2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェニル2,2,2-トリフルオロアセテート(150 μL 、0.871 mmol)を添加した。20分後、反応混合物を減圧下で濃縮乾固させて、標題化合物(100%理論収量=243 mg)と副生成物との混合物を得た。粗混合物をさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値597.91、実測値598.2。

30

【0106】

ステップ4: 7-クロロ-2-(4-(3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチル-N-(6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボキサミドの合成

40

ジメチルスルホキシド(1 mL)中のペルフルオロフェニル7-クロロ-2-(4-(3-(ジフルオロメトキシ)アゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボキシレート(≤ 243 mg、 ≤ 0.406 mmol)の溶液に、3-(アミノメチル)-6-メチル-4-(メチルチオ)ピリジン-2(1H)-オン(塩酸塩)(中間体1)(222 mg、1.20 mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(0.30 mL、1.71 mmol)を添加した。反応混合物を 60°C で1時間攪拌し、次いで強い窒素流下で一晩濃縮乾固させた。残留物を逆相フラッシュクロマトグラフィー(C18カラム、0.1%のトリフルオロ酢酸とともに水中0~100%の勾配のアセトニトリル)によって2回精製した。残留物をジ

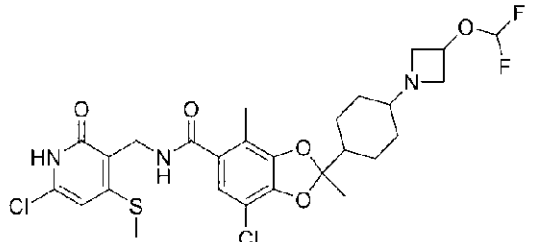
50

クロロメタンおよび炭酸水素ナトリウムの飽和溶液で希釈した。水層をジクロロメタンで洗浄した。合わせた有機層を硫酸ナトリウム上で乾燥させ、減圧下で濃縮して、標題化合物（166 mg、2段階で収率68%）を単一幾何異性体（シスまたはトランス）として得た。LCMS $[M+H]^+m/z$: 計算値598.1、実測値598.3。 ^1H NMR (400 MHz、メタノール- d_4) δ 6.88 (s、1H)、6.26 (s、1H)、6.38 (t、 $J=74.3$ Hz、2H)、4.71 (五重線、 $J=6.0$ Hz、1H)、4.48 (s、2H)、3.69–3.60 (m、2H)、3.18–3.11 (m、2H)、2.52 (s、3H)、2.29 (s、3H)、2.18 (s、3H)、2.10 (tt、 $J=3.5$ 、11.2 Hz、1H)、1.98–1.86 (m、4H)、1.85–1.78 (m、1H)、1.60 (s、3H)、1.32–1.21 (m、2H)、1.06–0.92 (m、2H)。

10

【表1】

表1. 以下の化合物は、適切な出発物質を使用して、実施例1と同様の様式で調製した。

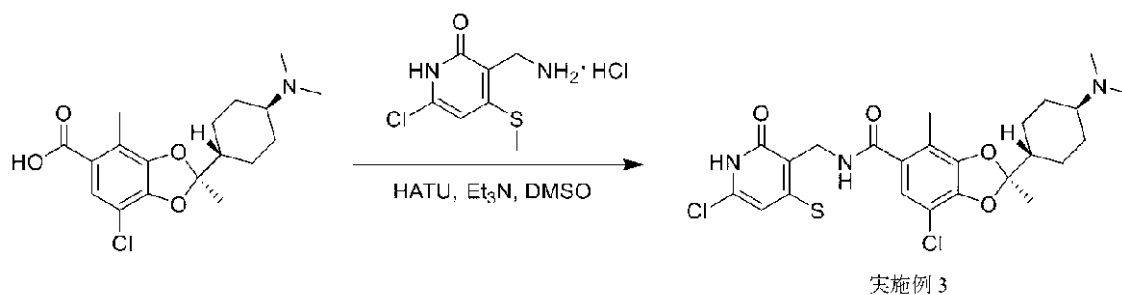
実施例	構造	分析データ
2	 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体) 中間体3および中間体4から調製 (ピーク2)	LCMS $[M-H]^+m/z$: 計算値618.1、実測値618.1。^1H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ 6.91–6.88 (m、1H)、6.58 (t、$J=5.4$ Hz、1H)、6.53 (s、1H)、6.39–5.97 (m、2H)、3.80 (d、$J=7.3$ Hz、2H)、3.14 (d、$J=6.4$ Hz、2H)、2.53–2.49 (m、3H)、2.26 (s、3H)、2.13 (br. s、1H)、1.99–1.78 (m、5H)、1.60 (s、3H)、1.45 (d、$J=3.4$ Hz、1H)、1.28–1.18 (m、2H)、1.15–1.01 (m、2H)。

20

【0107】

実施例#3: (R)-7-クロロ-N-((6-クロロ-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(トランス-4-(ジメチルアミノ)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

【化21】



40

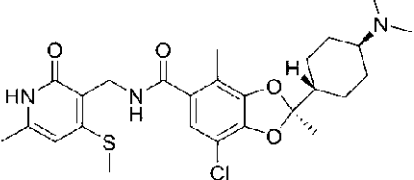
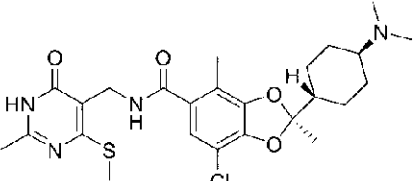
ジメチルスルホキシド (0.5 mL) 中の (R)-7-クロロ-2-(トランス-4-(ジメチルアミノ)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボン酸 (特許出願第US2017/0073335A1号に記載の手順に従って調製) (48 mg、0.1356 mmol) の溶液に、室温のトリエチルアミン (56.6 μ L、0.407 mmol) およびO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (41

50

・2 mg、0.108 mmol) を添加した。LCMS ($[M+H]^+m/z$: 368.2) による5分後の活性化エステルの形成は不完全であったので、追加のジメチルスルホキシド (1 mL) 中のO-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-ヘキサフルオロリン酸テトラメチルウロニウム (16 mg、0.042 mmol) を2回添加した。酸の活性化が完了した後、室温のジメチルスルホキシド (0.5 mL) 中の3-(アミノメチル)-6-クロロ-4-(メチルスルファニル)-1,2-ジヒドロピリジン-2-オン塩酸塩 (65.3 mg、0.271 mmol) およびトリエチルアミン (56.6 μ L、0.407 mmol) の懸濁液を添加した。反応混合物を60℃で45分間加熱し、次いでジクロロメタンおよび水で希釈した。疎水性フィルターを使用して有機層を乾燥させ、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー [シリカゲルKP-NHカラム、ヘプタン中0~100%の勾配の酢酸エチル、次いでジクロロメタン中0~100%のエタノール、次いで酢酸エチル中0~100%メタノール (20%の水酸化アンモニウムとともに)] によって精製して、表題化合物 (30 mg、収率41%) を白色の固体として得た。LCMS $[M+H]^+m/z$: 計算値540.5、実測値540.2。 ^1H NMR (400 MHz、メタノール- d_4) δ 6.89 (s、1H)、6.68 (s、1H)、4.50 (s、2H)、3.20 (tt、J=3.2、11.9 Hz、1H)、2.83 (s、6H)、2.53 (s、3H)、2.18 (s、3H)、2.16-2.08 (m、4H)、2.02-1.94 (m、1H)、1.62 (s、3H)、1.54 (dq、J=3.4、12.4 Hz、2H)、1.47-1.37 (m、2H)。

【表2】

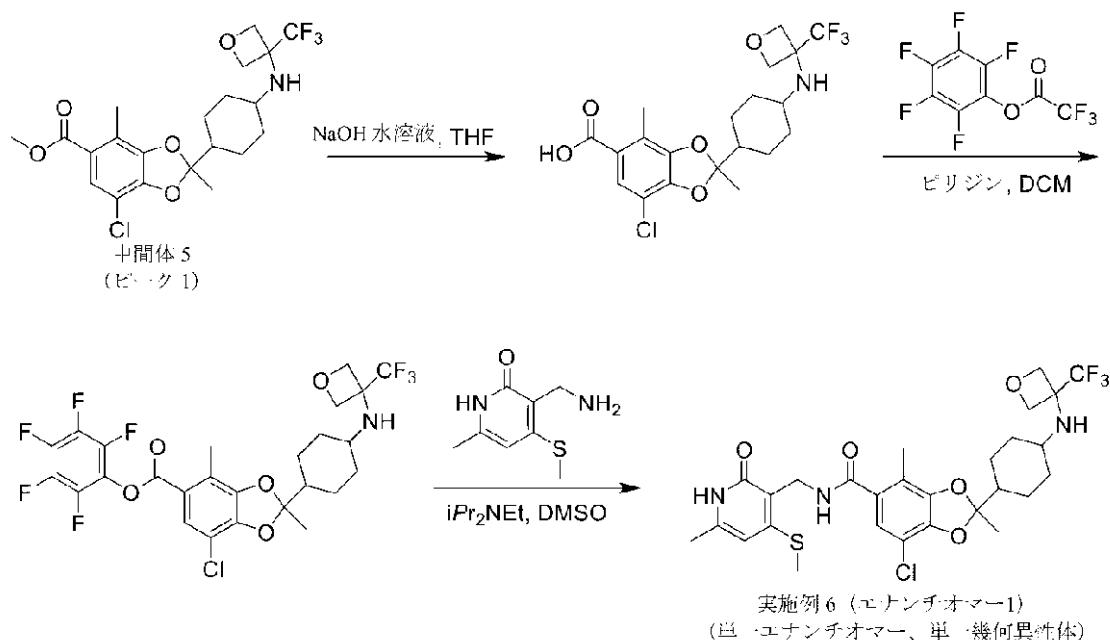
表2. 以下の化合物は、適切な出発物質を使用して、実施例3と同様の様式で調製した。

実施例	構造	分析データ
4	 (R エナンチオマー、トランス幾何異性体) 中間体1から調製	LCMS $[M+H]^+m/z$: 計算値520.2、実測値520.3。 ^1H NMR (400 MHz、ジメチルスルホキシド- d_6) δ 11.52 (br. s、1H)、8.00 (t、J=4.4 Hz、1H)、6.85 (s、1H)、6.08 (s、1H)、4.27 (d、J=4.4 Hz、2H)、3.57 (s、1H)、2.45 (s、3H)、2.17 (s、3H)、2.14 (s、9H)、1.92-1.77 (m、5H)、1.60 (s、3H)、1.15 (t、J=9.0 Hz、4H)
5	 (R エナンチオマー、トランス幾何異性体) 中間体2から調製	LCMS $[M+H]^+m/z$: 計算値521.2、実測値521.2。NMR (400 MHz、ジメチルスルホキシド- d_6) δ 12.60-12.19 (m、2H)、8.05 (t、J=4.4 Hz、1H)、6.87 (s、1H)、4.21 (d、J=4.4 Hz、2H)、2.47 (s、3H)、2.29 (s、2H)、2.19-2.12 (m、9H)、2.09 (br.s、1H)、1.94-1.76 (m、5H)、1.60 (s、3H)、1.15 (t、J=9.5 Hz、4H)

【0108】

実施例6 (エナンチオマー1): 7-クロロ-N-((6-クロロ-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(4-(ジメチルアミノ)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

【化 2 2】



10

ステップ 1：7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-〔4-〔〔3-〔トリフルオロメチル〕オキシタン-3-イル〕アミノ〕シクロヘキシル〕ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボン酸の合成

20

メタノール (1 mL) 中の 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-〔4-〔〔3-〔トリフルオロメチル〕オキシタン-3-イル〕アミノ〕シクロヘキシル〕-2H-1, 3-ベンゾジオキソール-5-カルボン酸メチル (中間体 5-ピーク 1) (81 mg、0.174 mmol) の溶液に、水酸化ナトリウム (72 mg、1.79 mmol) を添加した。反応混合物を 60℃で 20 分間加熱し、0℃に冷却し、次いで 1 M の塩酸で pH = 2 に酸性化した。次いで、所望の生成物をジクロロメタンで抽出し (3 回)、疎水性フィルターを使用して合わせた有機層を乾燥させた。濾液を減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物 (70 mg、89% 収率) を白色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 450.1、実測値 450.2。

30

【0109】

ステップ 2：ペルフルオロフェニル 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-〔4-〔〔3-〔トリフルオロメチル〕オキシタン-3-イル〕アミノ〕シクロヘキシル〕ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボキシレート

ジクロロメタン (0.5 mL) 中の 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-〔4-〔〔3-〔トリフルオロメチル〕オキシタン-3-イル〕アミノ〕シクロヘキシル〕ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボン酸 (70 mg、155 μmol) の溶液に、室温のピリジン (24.9 μL、310 μmol) および 2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル 2, 2, 2-トリフルオロアセテート (39.8 μL、232 μmol) を添加した。15 分後、反応物を減圧下で濃縮して、表題化合物と副産物との混合物 (68 mg、粗製) を得た。粗混合物をさらに精製することなく次のステップで使用した。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 616.1、実測値 616.2。

40

【0110】

ステップ 3：7-クロロ-2, 4-ジメチル-N-〔〔6-メチル-4-〔メチルチオ〕-2-オキソ-1, 2-ジヒドロピリジン-3-イル〕メチル〕-2-〔4-〔〔3-〔トリフルオロメチル〕オキシタン-3-イル〕アミノ〕シクロヘキシル〕ベンゾ[d][1, 3]ジオキソール-5-カルボキサミドの合成

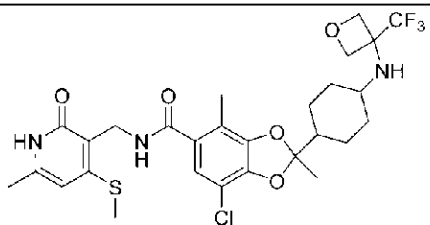
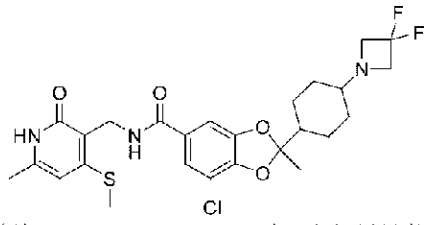
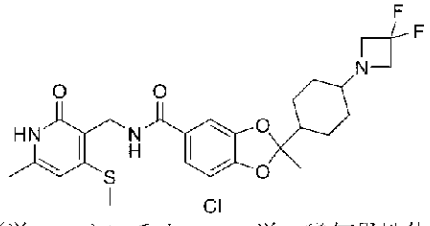
N, N-ジメチルホルムアミド (1 mL) 中の 2, 3, 4, 5, 6-ペンタフルオロフェニル 7-クロロ-2, 4-ジメチル-2-〔4-〔〔3-〔トリフルオロメチル〕オキ

50

セタン-3-イル] アミノ} シクロヘキシル] -2H-1, 3-ベンゾジオキサール-5-カルボキシレート ($\leq 68 \text{ mg}$ 、 $\leq 110 \mu\text{mol}$) の溶液に、室温の3-(アミノメチル)-6-メチル-4-(メチルスルファニル)-1, 2-ジヒドロピリジン-2-オン(遊離塩基) (30.4 mg 、 0.165 mmol) およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン (0.1 mL 、 $574 \mu\text{mol}$) を添加した。反応物を 50°C で30分間攪拌し、次いで逆相フラッシュクロマトグラフィー (C18カラム、0.1%のトリフルオロ酢酸とともに水中5~50%の勾配のアセトニトリル) による精製のために、C18カラムに直接添加して、表題化合物のトリフルオロ酢酸塩を得た。塩をジクロロメタン中に溶解させ、有機層を炭酸水素ナトリウムの飽和水溶液で洗浄した。最後に、有機層を減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物(遊離塩基) (42 mg 、収率62%) を白色の固体として得た。LCMS $[M+H]^+ m/z$: 計算値616.19、実測値616.3。 ^1H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ 12.62-12.44 (m, 1H)、7.16 (t, $J=5.1 \text{ Hz}$ 、1H)、6.91 (s, 1H)、6.04 (s, 1H)、4.76 (s, 3H)、4.62-4.46 (m, 4H)、2.72-2.63 (m, 1H)、2.49 (s, 3H)、2.32 (s, 3H)、2.27 (s, 3H)、1.92 (d, $J=5.9 \text{ Hz}$ 、4H)、1.80 (br. s.、1H)、1.60 (s, 3H)、1.36-1.10 (m, 6H)。

【表3】

表3. 以下の化合物は、適切な出発物質を使用して、実施例6と同様の様式で調製した。

実施例	構造	分析データ
6 (エナンチオマー2)	 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体) 中間体1および中間体5から調製(ピーク2)	LCMS $[M+H]^+ m/z$: 計算値616.19、実測値616.3。 ^1H NMR (400 MHz、クロロホルム-d) δ 12.45-12.30 (m, 1H)、7.14 (t, $J=5.4 \text{ Hz}$ 、1H)、6.91 (s, 1H)、6.04 (s, 1H)、4.75 (d, $J=7.3 \text{ Hz}$ 、2H)、4.61 (s, 2H)、4.55-4.51 (m, 2H)、2.68 (t, $J=9.5 \text{ Hz}$ 、1H)、2.49 (s, 3H)、2.32 (s, 3H)、2.27 (s, 3H)、1.92 (d, $J=6.4 \text{ Hz}$ 、4H)、1.83 (t, $J=11.7 \text{ Hz}$ 、1H)、1.61 (s, 3H)、1.35-1.12 (m, 6H)。
7 (エナンチオマー1)	 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体) 中間体1および中間体7から調製(ピーク1)	LCMS $[M+H]^+ m/z$: 計算値568.2、実測値568.3。 ^1H NMR (400 MHz、メタノール-d ₄) δ 6.93-6.84 (m, 1H)、6.27 (s, 1H)、4.48 (s, 2H)、3.67 (br t, $J=12.0 \text{ Hz}$ 、4H)、2.52 (s, 3H)、2.29 (s, 3H)、2.26-2.19 (m, 1H)、2.18 (s, 3H)、2.02-1.81 (m, 5H)、1.61 (s, 3H)、1.34-1.21 (m, 2H)、1.13-1.00 (m, 2H)。
7 (エナンチオマー2)	 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体) 注: 中間体1および中間体7から調製(ピーク2)	LCMS $[M+H]^+ m/z$: 計算値568.2、実測値568.3。 ^1H NMR (400 MHz、メタノール-d ₄) δ 6.89 (s, 1H)、6.27 (s, 1H)、4.49 (s, 2H)、3.61 (t, $J=12.0 \text{ Hz}$ 、4H)、2.53 (s, 3H)、2.29 (s, 3H)、2.23-2.08 (m, 4H)、2.03-1.78 (m, 5H)、1.61 (s, 3H)、1.35-1.22 (m, 2H)、1.12-0.99 (m, 2H)。

10

20

30

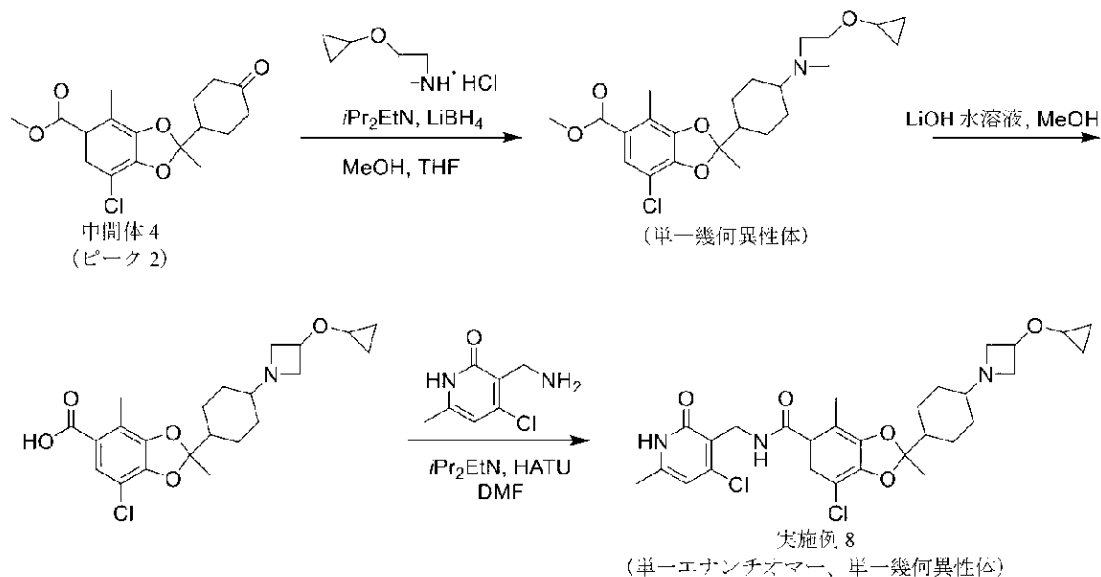
40

50

【0111】

実施例 8：7-クロロ-2-（（4-クロロ-6-メチル-2-オコソ-1，2-ジヒドロピリジン-3-イル）メチル）-2-（4-（3-シクロプロポキシアゼチジン-1-イル）シクロヘキシル）-2，4-ジメチルベンゾ[d][1，3]ジオキソール-5-カルボキサミド

【化23】



10

20

ステップ 1：7-クロロ-2-（4-（3-シクロプロポキシアゼチジン-1-イル）シクロヘキシル）-2，4-ジメチルベンゾ[d][1，3]ジオキソール-5-カルボン酸メチルの合成

メタノール（10 mL）中の 3-（シクロプロポキシ）アゼチジン塩酸塩（1.9 g、12.7 mmol）および N，N-ジイソプロピルエチルアミン（2.7 mL、15.5 mmol）の溶液を室温で 1 時間攪拌した後、テトラヒドロフラン（30 mL）中の 7-クロロ-2，4-ジメチル-2-（4-オキソシクロヘキシル）-1，3-ベンゾジオキソール-5-カルボン酸メチル（中間体 4-ピーク 2）（860 mg、2.54 mmol）の別の溶液の溶液を添加した。反応混合物を室温で 1.5 時間攪拌し、次いで -70℃ に冷却した。水素化ホウ素リチウム（120 mg、5.51 mmol）を添加し、反応物を -70℃ で 30 分間 [または出発物質の完全な消費が TLC、酢酸エチル/メタノール 5：1 によって観察されるまで] 攪拌した。次に、反応物を塩化アンモニウムの飽和水溶液（100 mL）でクエンチし、所望の生成物を酢酸エチル（50 mL × 2）で抽出した。合わせた有機層をブライン（30 mL）で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させた。残留物をフラッシュクロマトグラフィー（シリカゲル、石油エーテル中 50～100% の勾配の酢酸エチル）によって精製して、表題化合物（760 mg、収率 65%、純度 95%）を黄色の油として得た。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値 436.1、実測値 436.0。

30

40

【0112】

ステップ 2：7-クロロ-2-（4-（3-シクロプロポキシアゼチジン-1-イル）シクロヘキシル）-2，4-ジメチルベンゾ[d][1，3]ジオキソール-5-カルボン酸の合成

メタノール（15 mL）および水（3 mL）中の 7-クロロ-2-（4-（3-シクロプロポキシアゼチジン-1-イル）シクロヘキシル）-2，4-ジメチルベンゾ[d][1，3]ジオキソール-5-カルボン酸メチル（760 mg、1.74 mmol）の溶液に、水酸化リチウム水和物（962 mg、22.93 mmol）を添加した。反応物を 70℃ で 15 時間攪拌し、次いで減圧下で濃縮した。水（15 mL）を添加し、0℃ のクエ

50

ン酸の飽和水溶液でpHを6に調整した。所望の生成物を、ジクロロメタンとイソプロパノールとの10:1混合物(30mL×3)で抽出した。合わせた有機層をブライン(150mL×2)で洗浄し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮乾固させて、表題化合物(720mg、粗製)を黄色の固体として得、これをさらに精製することなく次のステップで使用了。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値422.1、実測値422.0。

【0113】

ステップ3: 7-クロロ-N-((4-クロロ-6-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(4-(3-シクロプロポキシアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミドの合成

N,N-ジメチルホルムアミド(4mL)中の7-クロロ-2-[4-[3-(シクロプロポキシ)アゼチジン-1-イル]シクロヘキシル]-2,4-ジメチル-1,3-ベンゾジオキサール-5-カルボン酸(360mg、0.853mmol)の溶液に、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(500mg、1.31mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(1mL、5.74mmol)を添加した。混合物を15℃で30分間攪拌した後、3-(アミノメチル)-4-クロロ-6-メチル-1H-ピリジン-2-オン塩酸塩(中間体6)(250mg、1.2mmol)を添加した。反応混合物を15℃でさらに4時間攪拌し、次いで濾過した。濾液を分取HPLC[カラム: Waters Xbridge(150mm×25mm、5μm)。移動相A: 水(0.05%の水酸化アンモニウムv/v/移動相B: アセトニトリル。勾配(移動相Aの65~55%/移動相Bの35~65%、9.5分以上)。カラム温度: 30℃]によって精製して、表題化合物(209mg、収率42%)を白色の固体として得た。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値576.2、実測値576.2。¹H NMR(400MHz、メタノール-d₄) δ 6.90(s、1H)、6.30(s、1H)、4.52(s、2H)、4.22(五重線、J=6.0Hz、1H)、3.61(dd、J=6.4、8.6Hz、2H)、3.31-3.25(m、1H)、2.99(dd、J=6.3、8.4Hz、2H)、2.28(s、3H)、2.20(s、3H)、2.12-2.04(m、1H)、1.99-1.85(m、5H)、1.62(s、3H)、1.33-1.24(m、2H)、1.06-0.95(m、2H)、0.56-0.51(m、2H)、0.51-0.44(m、2H)。

10

20

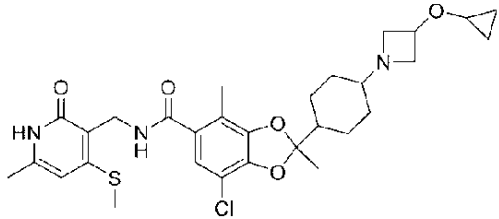
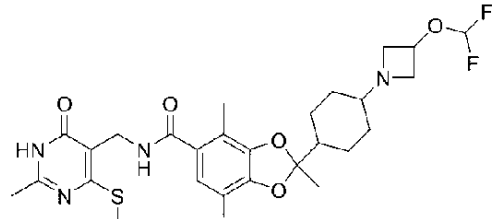
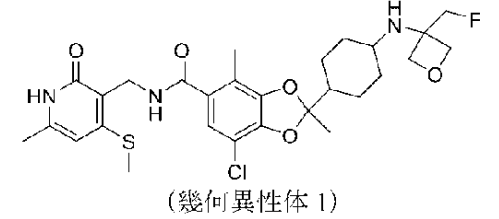
30

40

50

【表 4 - 1】

表 4. 以下の化合物は、適切な出発物質を使用して、実施例 8 と同様の様式で調製した。

実施例	構造	分析データ
9	 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体) 中間体 1 および中間体 4 から調製 (ピーク 2)	LCMS[M+H]⁺m/z: 計算値 588.2、実測値 588.2。¹H NMR (400 MHz、メタノール-d₄) δ 6.91 (s, 1H)、6.29 (s, 1H)、4.53 (s, 2H)、4.26 - 4.17 (m, 1H)、3.69 - 3.59 (m, 2H)、3.30 - 3.24 (m, 1H)、3.06 - 2.94 (m, 2H)、2.54 (s, 3H)、2.31 (s, 3H)、2.21 (s, 3H)、2.10 - 2.02 (m, 1H)、1.99 - 1.80 (m, 5H)、1.62 (s, 3H)、1.35 - 1.18 (m, 2H)、1.08 - 0.93 (m, 2H)、0.58 - 0.50 (m, 2H)、0.50 - 0.42 (m, 2H)。
10	 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体) 中間体 2 および中間体 4 から調製 (ピーク 2)	LCMS[M+H]⁺m/z: 計算値 599.2、実測値 599.1。¹H NMR (400 MHz、メタノール-d₄) δ 6.92 (s, 1H)、6.40 (t, J = 76 Hz, 1H)、4.73 (t, J = 8 Hz, 1H)、4.43 (s, 2H)、3.68 - 3.64 (m, 2H)、3.18 - 3.14 (m, 2H)、2.57 (s, 3H)、2.40 (s, 3H)、2.21 (s, 3H)、2.14 - 2.09 (m, 1H)、1.97 - 1.83 (m, 5H)、1.62 (s, 3H)、1.32 - 1.23 (m, 2H)、1.05 - 0.95 (m, 2H)。
11	 (幾何異性体 1) 中間体 1 および中間体 4 から調製 (ピーク 2)	LCMS[M+H]⁺m/z: 計算値 580.2、実測値 580.2。¹H NMR (400 MHz、メタノール-d₄) δ 6.91 (s, 1H)、6.29 (s, 1H)、4.82 - 4.79 (m, 1H)、4.68 (s, 1H)、4.55 (dd, J = 4.0、6.4 Hz, 2H)、4.52 - 4.46 (m, 4H)、2.63 (br t, J = 10.8 Hz, 1H)、2.55 (s, 3H)、2.31 (s, 3H)、2.21 (s, 3H)、1.94 (br d, J = 13.2 Hz, 2H)、1.89 - 1.80 (m, 3H)、1.62 (s, 3H)、1.31 (q, J = 12.0 Hz, 2H)、1.25 - 1.15 (m, 2H)。

10

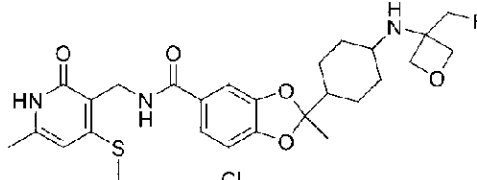
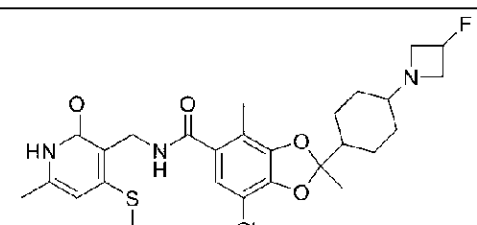
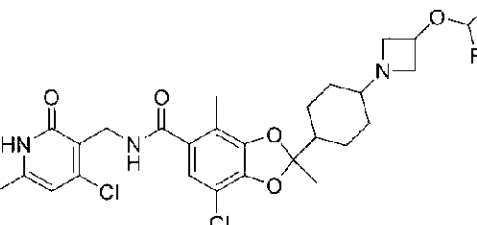
20

30

40

50

【表 4 - 2】

11	 (幾何異性体 2) 中間体 1 および 中間体 4 から調製 (ピーク 2)	LCMS[M+H]⁺m/z: 計算値 580.2、実測値 580.1。¹H NMR (400 MHz、メタノール-d₄) δ 6.91 (s, 1H)、6.30 (s, 1H)、4.75 (s, 1H)、4.63 (s, 1H)、4.62 - 4.59 (m, 2H)、4.52 - 4.47 (m, 4H)、3.06 (br s, 1H)、2.55 (s, 3H)、2.31 (s, 3H)、2.22 (s, 3H)、1.91 (br d, J = 10.4 Hz, 1H)、1.68 (br d, J = 8.4 Hz, 4H)、1.65 (s, 5H)、1.61 (br s, 1H)、1.57 (br s, 1H)。
12	 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体) 中間体 1 および 中間体 4 から調製 (ピーク 2)	LCMS[M+H]⁺m/z: 計算値 572.2、実測値 571.9。¹H NMR (400 MHz、メタノール-d₄) δ 6.89 (s, 1H)、6.27 (s, 1H)、4.96 - 5.23 (m, 1H)、4.48 (s, 2H)、3.54 - 3.69 (m, 2H)、3.18 - 3.30 (m, 2H)、2.52 (s, 3H)、2.29 (s, 3H)、2.19 (s, 3H)、2.06 - 2.15 (m, 1H)、1.80 - 1.98 (m, 5H)、1.61 (s, 3H)、1.19 - 1.32 (m, 2H)、0.93 - 1.05 (m, 2H)。
13	 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体) 中間体 6 および 中間体 4 から調製 (ピーク 2)	LCMS[M+H]⁺m/z: 計算値 586.2、実測値 586.1。¹H NMR (400MHz、メタノール-d₄) δ 6.90 (s, 1H)、6.40 (t, J = 76 Hz, 1H)、6.30 (s, 1H)、4.73 (t, J = 8 Hz, 1H)、4.53 (s, 2H)、3.68 - 3.64 (m, 2H)、3.18 - 3.14 (m, 2H)、2.28 (s, 3H)、2.20 (s, 3H)、2.15 - 2.08 (m, 1H)、1.97 - 1.83 (m, 5H)、1.63 (s, 3H)、1.35 - 1.23 (m, 2H)、1.05 - 0.90 (m, 2H)。

【0114】

実施例 14: (R)-7-クロロ-2,4-ジメチル-N-((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボキサミドおよび (S)-7-クロロ-2,4-ジメチル-N-((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキソール-5-カルボキサミド

10

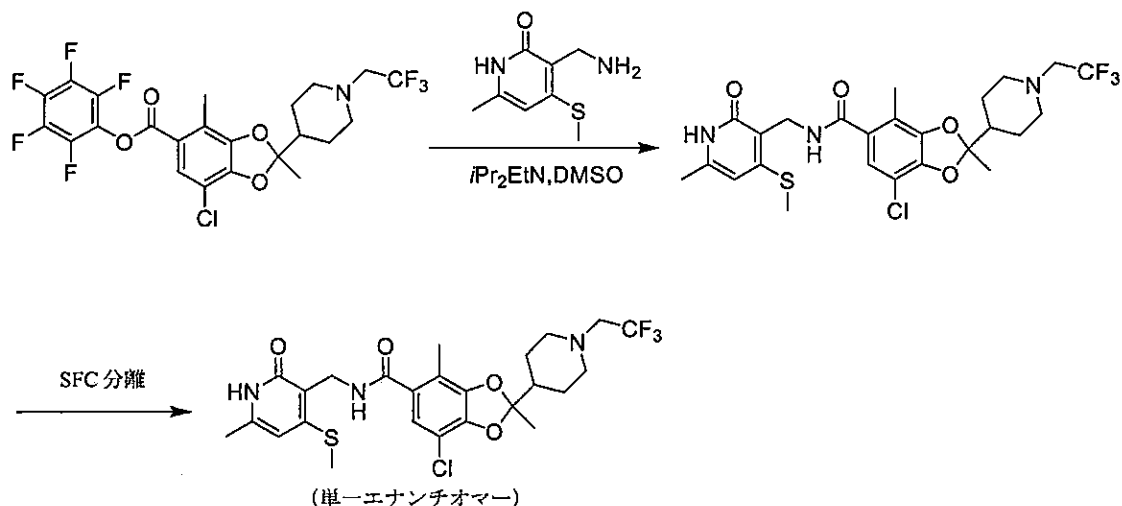
20

30

40

50

【化 2 4】



10

ステップ1：7-クロロ-2,4-ジメチル-N-((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミドの合成

20

ジメチルスルホキシド(4mL)中の2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェニル7-クロロ-2,4-ジメチル-2-[1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル]-2H-1,3-ベンゾジオキサール-5-カルボキシレート(中間体8)(752mg、1.34mmol)の溶液に、3-(アミノメチル)-6-メチル-4-(メチルスルファニル)-1,2-ジヒドロピリジン-2-オン(中間体1)(740mg、4.02mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(932μL、5.36mmol)を添加した。反応混合物を60℃で加熱し、1時間後、精製のためにC18カラムに添加した。所望の生成物を逆相フラッシュクロマトグラフィー(C18カラム、0.1%のトリフルオロ酢酸とともに水中0%~100%の勾配のアセトニトリル)によって2回精製して、表題化合物(289mg、収率38%)をガムとしてのラセミ混合物として得た。

30

【0115】

ステップ2：(R)-7-クロロ-2,4-ジメチル-N-((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミドと、(S)-7-クロロ-2,4-ジメチル-N-((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミドとの分離

40

7-クロロ-2,4-ジメチル-N-((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド(289mg)のラセミ混合物を分取SFC[カラム：E S IndustriesからのChromegaChiral CC4(内径250mm×20mm)。移動相A：CO₂/移動相B：メタノール中0.25%のイソプロピルアミン。無勾配(移動相A55%および移動相B45%)。流量：80g/分。カラム温度：25℃]によって分離した。SFC分析方法：カラム：Chiral TechnologiesからのChiralcel OX-H(内径100mm×4.6mm)。移動相A：CO₂/移動相B：メタノール中0.1%のイソプロピルアミン。無勾配(移動相A75%および移動相B25%)。流量：4mL/分。カラム温度：40℃。実施例16(エナンチオマー1

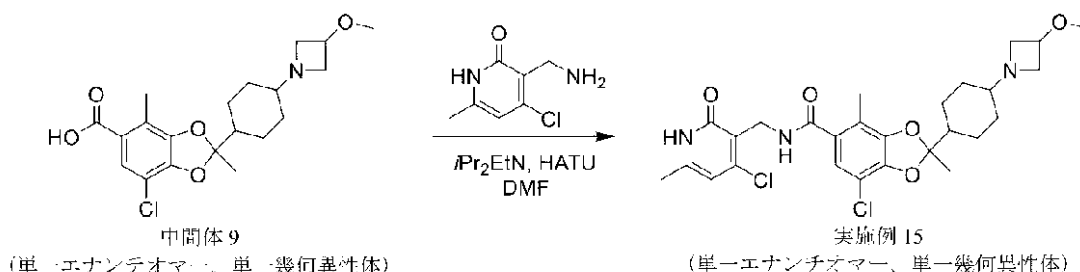
50

)(所望のエナンチオマー／ユートマー)：保持時間＝3.74分(SFC分析方法)。回収＝90mg、収率12%、99%ee(黄色の固体)。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値560.2、実測値560.2。¹H NMR (400MHz、メタノール-d₄) δ 6.89 (s、1H)、6.27 (s、1H)、4.49 (s、2H)、3.08–2.98 (m、4H)、2.52 (s、3H)、2.34 (br t、J=11.0Hz、2H)、2.29 (s、3H)、2.20 (s、3H)、1.93–1.84 (m、1H)、1.83–1.76 (m、2H)、1.62 (s、3H)、1.60–1.47 (m、2H)。実施例16(エナンチオマー2)(不要なエナンチオマー／ジストマー)：保持時間＝4.25分(SFC分析方法)。回収＝101mg、収率13%、98%ee、(黄色の固体)。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値560.2、実測値560.2。¹H NMR (400MHz、メタノール-d₄) δ 6.89 (s、1H)、6.27 (s、1H)、4.49 (s、2H)、3.08–2.98 (m、4H)、2.52 (s、3H)、2.34 (br t、J=11.0Hz、2H)、2.29 (s、3H)、2.20 (s、3H)、1.93–1.84 (m、1H)、1.83–1.76 (m、2H)、1.62 (s、3H)、1.60–1.47 (m、2H)。

【0116】

実施例15：7-クロロ-N-((4-クロロ-6-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2-(4-(3-メトキシアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

【化25】

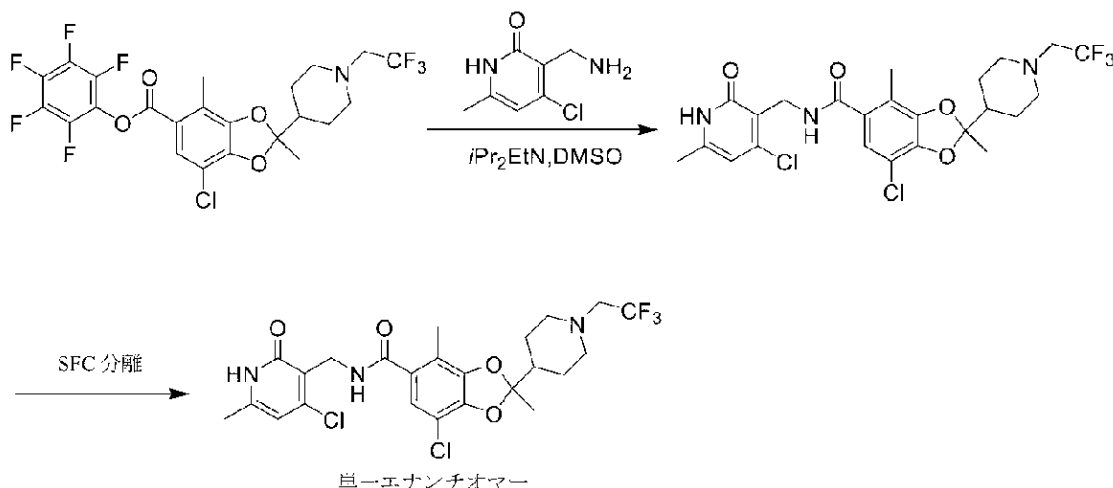


N,N-ジメチルホルムアミド(5mL)中の7-クロロ-2-(4-(3-(メトキシアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボン酸(900mg、2.27mmol)の溶液に、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(1.04g、2.73mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(2.38mL、13.6mmol)を添加した。混合物を25℃で30分間攪拌した後、3-(アミノメチル)-4-クロロ-6-メチル-1H-ピリジン-2-オン塩酸塩(中間体6)(710mg、3.4mmol)を添加した。反応混合物を室温でさらに1.5時間攪拌し、次いで濾過した。濾液を分取HPLC[カラム：YMC-Actus Triart C18(100mm×30mm、5μm)。移動相A：水(0.05%塩酸)／移動相B：アセトニトリル。勾配(移動相Aの85～55%／移動相Bの15～45%、10分以上)。カラム温度：30℃およびカラム：Xtimate C18(150mm×25mm、5μm)。移動相A：水(0.05%の水酸化アンモニウムv/v)／移動相B：アセトニトリル。勾配(移動相Aの69～39%／移動相Bの31～61%、7分以上)。カラム温度：30℃]によって2回精製して、表題化合物(533mg、43%収率、>99%純度)を白色の固体として得た。LCMS [M+H]⁺m/z：計算値550.2、実測値550.1。¹H NMR (400MHz、クロロホルム-d) δ 11.97 (br、1H)、7.06–7.03 (m、1H)、6.88 (s、1H)、6.19 (s、1H)、4.65 (d、J=6.0Hz、2H)、4.05–4.01 (m、1H)、3.66–3.62 (m、2H)、3.25 (s、3H)、

2.93-2.90 (m, 2H)、2.28 (s, 3H)、2.25 (s, 3H)、1.93-1.81 (m, 6H)、1.60 (s, 3H)、1.25-1.02 (m, 4H)。
【0117】

実施例16：(R)-7-クロロ-N-((4-クロロ-6-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2,4-ジメチル-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミドおよび(S)-7-クロロ-N-((4-クロロ-6-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2,4-ジメチル-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

【化26】



ステップ1：7-クロロ-N-((4-クロロ-6-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2,4-ジメチル-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミドの合成

ジメチルスルホキシド(1mL)中の2,3,4,5,6-ペンタフルオロフェニル7-クロロ-2,4-ジメチル-2-[1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル]-2H-1,3-ベンゾジオキサール-5-カルボキシレート(中間体8)(188mg、0.3358mmol)の溶液に、3-(アミノメチル)-4-クロロ-6-メチル-1,2-ジヒドロピリジン-2-オン塩酸塩(中間体6)(70.2mg、0.336mmol)およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン(233μL、1.34mmol)を添加した。反応混合物を60℃で加熱し、1時間後、精製のためにC18カラムに添加した。所望の生成物を逆相フラッシュクロマトグラフィー(C18カラム、0.1%のトリフルオロ酢酸とともに水中0%~100%の勾配のアセトニトリル)によって2回精製して、表題化合物(180mg、収率98%)をガムとしてのラセミ混合物として得た。

【0118】

ステップ2：(R)-7-クロロ-N-((4-クロロ-6-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2,4-ジメチル-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミドと、(S)-7-クロロ-N-((4-クロロ-6-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2,4-ジメチル-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミドとの分離

7-クロロ-N-((4-クロロ-6-メチル-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)-2,4-ジメチル-2-(1-(2,2,2-トリフルオロエチル)ピペリジン-4-イル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

ル) ピペリジン-4-イル) ベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-カルボキサミド (180 mg) のラセミ混合物を分取 SFC [カラム: ES Industries からの Chromega Chiral CC4 (内径 250 mm × 20 mm)。移動相 A: CO₂ / 移動相 B: メタノール中 0.25% のイソプロピルアミン。無勾配 (移動相 A 65% および 移動相 B 35%)。流量: 80 g/分。カラム温度: 25℃] によって分離した。SFC 分析方法: カラム: Chiral Technologies からの Chiral cel OZ-H (内径 100 mm × 4.6 mm、xx μm)。移動相 A: CO₂ / 移動相 B: メタノール中 0.1% のイソプロピルアミン。無勾配 (移動相 A の 65% および 移動相 B の 35%)。流量: 4 mL/分。カラム温度: 40℃。実施例 17 (エナンチオマー-1) (所望のエナンチオマー/ユートマー): 保持時間 = 0.73 分 (SFC 分析方法)。回収 = 61 mg、収率 33%、100% ee (黄色の固体)。実施例 17 (エナンチオマー-2) (不要なエナンチオマー/ジストマー): 保持時間 = 0.98 分 (SFC 分析方法)。回収 = 63 mg、収率 34%、97% ee (黄色の固体)。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 548.1、実測値 548.2。¹H NMR (400 MHz、メタノール-d₄) δ 6.89 (s, 1H)、6.29 (s, 1H)、4.52 (s, 2H)、3.04 (q, J = 9.8 Hz, 4H)、2.35 (br t, J = 11.0 Hz, H)、2.27 (s, 3H)、2.19 (s, 3H)、1.95–1.85 (m, 1H)、1.85–1.75 (m, 2H)、1.63 (s, 3H)、1.62–1.50 (m, 2H)。

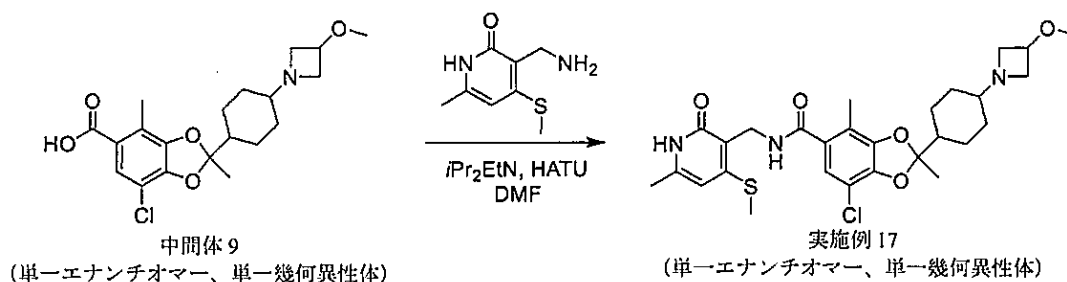
10

【0119】

20

実施例 17: 7-クロロ-2-(4-(3-メトキシアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチル-N-((6-メチル-4-(メチルチオ)-2-オキソ-1,2-ジヒドロピリジン-3-イル)メチル)ベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-カルボキサミド

【化 27】



30

N, N-ジメチルホルムアミド (50 mL) 中の 7-クロロ-2-(4-(3-(メトキシアゼチジン-1-イル)シクロヘキシル)-2,4-ジメチルベンゾ [d] [1, 3] ジオキソール-5-カルボン酸 (中間体 9-単一エナンチオマーおよび幾何異性体) (5 g、12.63 mmol) の溶液に、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (5.7 g、14.99 mmol) および N, N-ジイソプロピルエチルアミン (11 mL、63.15 mmol) を添加した。混合物を 20℃ で 30 分間攪拌した後、3-(アミノメチル)-6-メチル-4-(メチルチオ)ピリジン-2 (1H)-オン塩酸塩 (中間体 1) (4.2 g、19.03 mmol) を添加した。反応混合物を室温でさらに 1.5 時間攪拌し、次いで濾過した。濾液を分取 HPLC [カラム: Phenomenex Gemini C18 (250 mm × 50 mm、10 μm)。移動相 A: 水 (0.04% の水酸化アンモニウム v/v および 10 mM の炭酸水素アンモニウム) / 移動相 B: アセトニトリル。勾配 (移動相 A の 75 ~ 44% / 移動相 B の 25 ~ 56%、23 分以上)。カラム温度: 30℃] によって精製して、表題化合物 (4.4 g、収率 60%、純度 96%) を白色の固体として得た。LCMS [M+H]⁺m/z: 計算値 562.2、実測値 562.2。¹H NMR (400 MHz、メタノール-d₄) δ 6.91 (s, 1H)、6.29 (s,

40

50

1 H)、4.50 (s、2 H)、4.01 (五重線、J=6 Hz、1 H)、3.58 (dd、J=8.8、6.4 Hz、2 H)、3.26 (s、3 H)、2.92–3.02 (m、2 H)、2.54 (s、3 H)、2.31 (s、3 H)、2.21 (s、3 H)、2.01–2.11 (m、1 H)、1.79–2.00 (m、5 H)、1.62 (s、3 H)、1.19–1.34 (m、2 H)、0.91–1.08 (m、2 H)。

【0120】

EZH2アッセイ

EZH2を使用する阻害剤のIC₅₀測定

EZH2生化学アッセイ(IC₅₀)：化合物の効力は、³H-SAMをビオチン化H3ペプチドに組み込むことによって評価した。具体的には、wt EZH2 (社内で調製した五量体複合体) を含有する30 pMのPRC2を、50 mMのTris (pH 8.5)、1 mMのDTT、0.07 mMのBrij-35、0.1%のBSA、および0.8% DMSOの総量12.5 μl中で、450 nMのSAM、450 nMの³H-SAM、2 μMのH3K27me3活性化ペプチド(H₂N-RKQLATKAAR(Kme3)SAPATGGVKKP-アミド)、および化合物(DMSO中10ポイントの二重用量反応滴定(duplicate dose response titration)、最終アッセイ0.8% DMSO (v/v))とともに事前に3~5時間インキュベートした。反応は、2 μMストックとしてビオチン化H3基質ペプチド(H₂N-RKQLATKAAR(Kme1)SAPATGGVKKP-NTPEGBiot)を12.5 μlの緩衝液中で開始し、室温で18~22時間反応させた。20 μlのSTOP溶液(50 mMのTris (pH 8.5)、200 mMのEDTA、2 mMのSAH)を添加することによって、クエンチを完了した。35 μlのクエンチした溶液をストレプトアビジンでコーティングしたFlash Plates (PerkinElmer)に移し、1~2時間インキュベートし、洗浄し、Top Count Reader (PerkinElmer)で読み取った。IC₅₀は、非線形最小二乗法4パラメーターフィットを使用するGene data Screenerで計算し、4つのパラメーターが、IC₅₀、Hill slope、移行前のベースライン(0%のINH)、および移行後のベースライン(100%のINH)であった。

【0121】

HeLa細胞アッセイにおける阻害剤のEC₅₀測定

H3K27me3アルファHeLaアッセイ(AlphaLISA)。各試験化合物の10腫の異なる用量(一連の3倍希釈)を、384ウェルの組織培養処理プレート2枚(カタログ#6007680、Perkin Elmer (Waltham, MA))にプレーティングした。培養で成長させたHeLa細胞をトリプシン処理し、Countess (登録商標)セルカウンター(カタログ#C10281、Life Technologies (Grand Island, NY))を使用してカウントした。細胞を10%のDMEM(カタログ#10569-010、Life Technologies (Grand Island, NY))中1 mLあたり67,000個の細胞に希釈し、15 μL(1,000細胞)を、Biotek MicroFlo (商標) Select Dispenser (BioTek Instruments, Inc. (Vermont, USA))の384ウェルプレートを使用して各ウェルにプレーティングした。プレートを37℃/5%のCO₂で72時間インキュベートした。2つのプレートのうちの1つは、HeLaアッセイ用に処理し、もう1つは、生存率用に処理した。1ウェルあたり5 μLのCell-Histone Lysis緩衝液(1X)(カタログ#AL009F1 Perkin Elmer (Waltham, MA))をAlphaLISA用に処理したプレートに添加し、プレートを低速のプレートシェーカー(モデル#4625-Q Thermo Scientific (Waltham, MA))を用いてRTで30分間インキュベートした。次いで、1ウェルあたり10 μLのHistone Extraction緩衝液(カタログ#AL009F2、Perkin Elmer (Waltham, MA))を添加し、プレートを低速のプレートシェーカーを用いてRTで20分間さ

10

20

30

40

50

らにインキュベートした。次に、抗K27me3アクセプタービーズとビオチン化抗ヒストンH3 (C-ter) 抗体 (最終的に3 nMに希釈) (カタログ#AL118 Perkin Elmer (Waltham, MA)) との5 X 混合液10 μ Lを各ウェルに添加した。アクセプタービーズおよび抗ヒストンH3の希釈は、提供された10 X ストックを希釈することによって生成した1 X Histone Detection 緩衝液 (カタログ#AL009F3 Perkin Elmer (Waltham, MA)) で行った。プレートをアルミニウムプレートシーラーで密封し、23°Cで60分間インキュベートした。次に、Streptavidin Donorビーズの5 X 溶液10 μ L (カタログ#6760002 Perkin Elmer (Waltham, MA)) (1 X Histone Detection 緩衝液中最終20 μ g/mL) を添加し、プレートをアルミニウムプレートシーラーで密封し、23°Cで30分間インキュベートした。次いでEnVision-Alpha Reader (モデル#2104 Perkin Elmer (Waltham, MA)) を使用してプレートを読み取った。

10

培地を含む細胞とともに15 μ LのCell Titer Glo ((カタログ#G9241 Promega Madison (WI)) を各ウェルに添加することによって、細胞生存率をアッセイした。プレートを低速のプレートシェーカーを用いてRTで15~20分間インキュベートした。次いで、EnVision-Alpha Reader (モデル#2104 Perkin Elmer (Waltham, MA)) を使用してプレートを読み取った。

20

【0122】

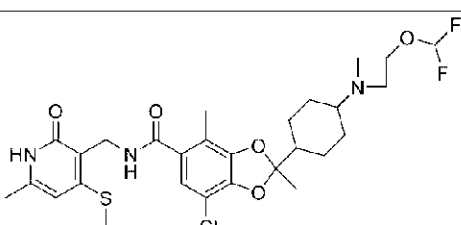
Karpas-422 生存率アッセイにおける阻害剤のGI₅₀ 測定

Karpas-422 細胞株は、DSMZ (Braunschweig, Germany) から入手し、RPMI-1640 培地で成長させた。すべての培地は、10%のウシ胎児血清 (FBS) および1%のペニシリン/ストレプトマイシン (Invitrogen) を含有した。1ウェルあたり20Kの細胞を、化合物でコーティングされた96ウェルプレートにプレーティングした。細胞を分割し、元のプレーティング密度 (DMSOウェル数に基づく) で4日ごとに新鮮なEZH2 阻害剤を含有するプレートに播種した。相対細胞数は、8日目にCell Titer-Glo 発光細胞生存率アッセイ (Promega) によって評価した。カーブフィッティングにGraphPad Prism 5を使用し、GI₅₀ 値を報告した。データを表5に示す。

30

【表5-1】

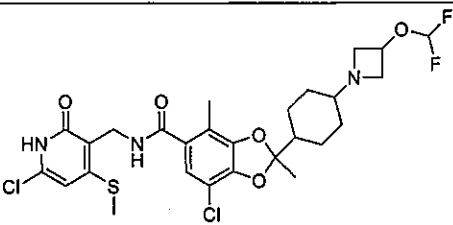
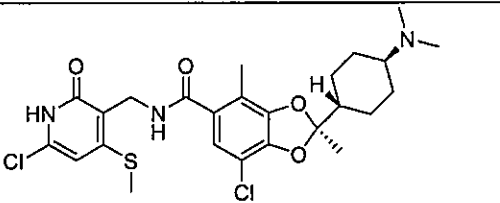
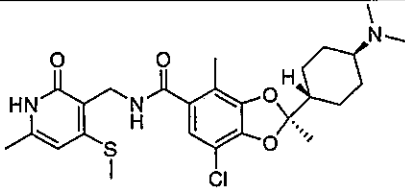
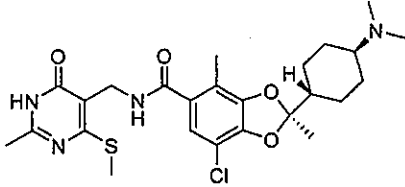
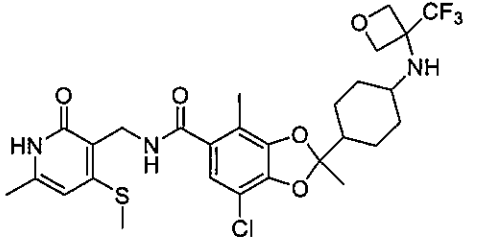
表5.

実施例	EZH2 IC ₅₀ (pM)	HeLa EC ₅₀ (nM)	Karpas-422 GI ₅₀ (nM)
 実施例 1 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	91	0.52	3.9

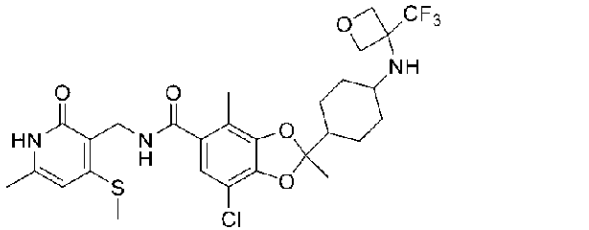
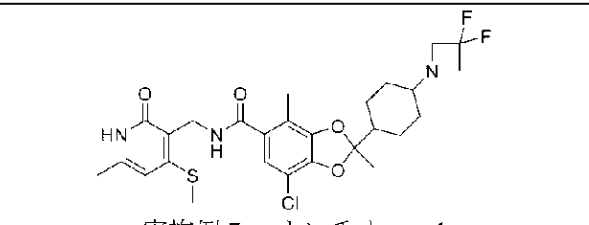
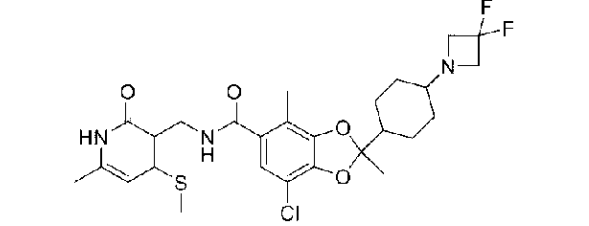
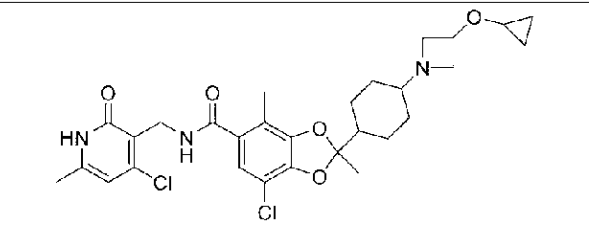
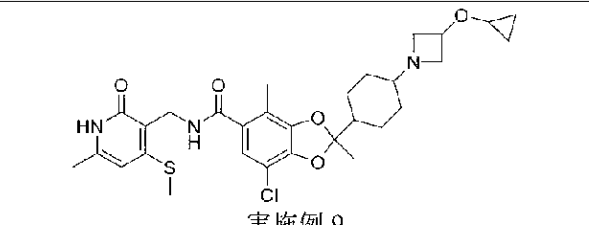
40

50

【表 5 - 2】

 実施例 2 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	1,500	15	250
 実施例 3	370	2.4	29
 実施例 4 (R エナンチオマー、トランス幾何異性体)	38	0.51	4.0
 実施例 5 (R エナンチオマー、トランス幾何異性体)	54	3.6	22
 実施例 6-エナンチオマー1 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	1,800	39	720

【表 5 - 3】

 実施例 6-エナンチオマー2 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	140	4.2	53
 実施例 7-エナンチオマー1 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	8,600		
 実施例 7-エナンチオマー2 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	120		12
 実施例 8 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	39	0.52	5.0
 実施例 9 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	54	0.61	3.7

10

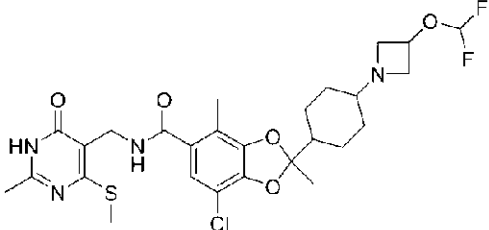
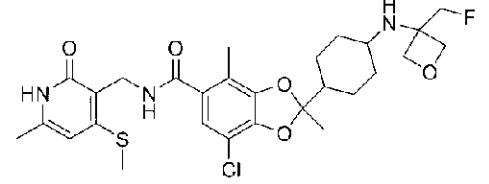
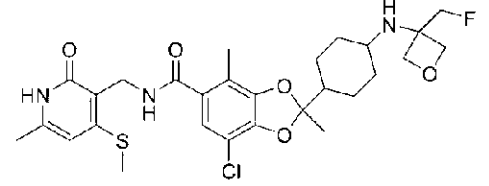
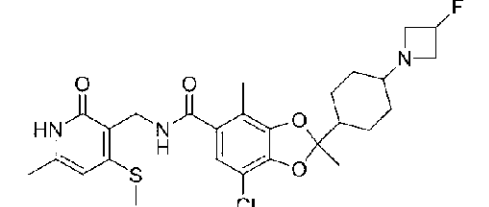
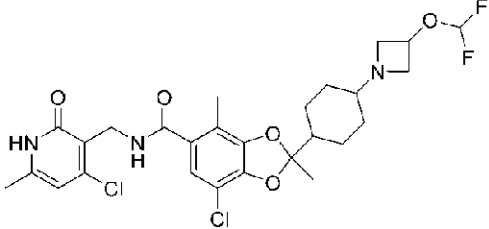
20

30

40

50

【表 5 - 4】

 実施例 10 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	202	1.9	20
 実施例 11 (単一エナンチオマー、幾何異性体 1)	140	1.3	8.6
 実施例 11 (単一エナンチオマー、幾何異性体 2)	180	1.7	
 実施例 12 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	92	0.59	4.4
 実施例 13 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	84	0.81	9.7

10

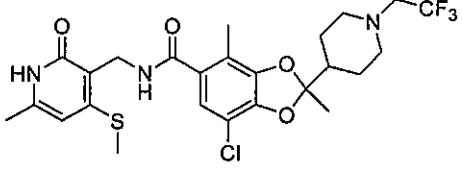
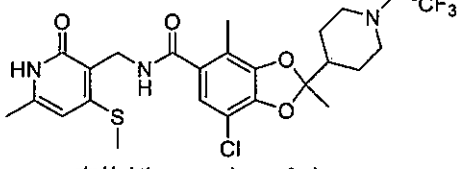
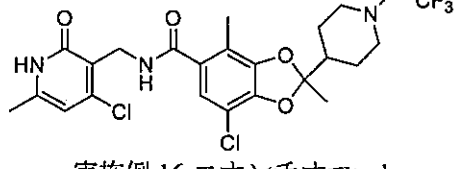
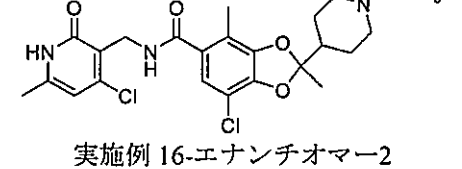
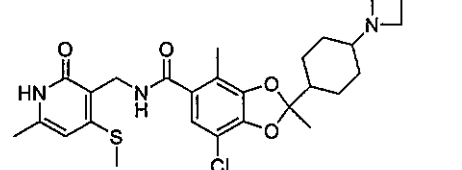
20

30

40

50

【表 5 - 5】

 実施例 14-エナンチオマー1 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	37	1.4	
 実施例 14-エナンチオマー2 (単一エナンチオマー)	7,000	210	
 実施例 16-エナンチオマー1 (単一エナンチオマー)	310	22	
 実施例 16-エナンチオマー2 (単一エナンチオマー)	>10,000	>300	
 実施例 17 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	43	0.33	3.5

【0123】

滞留時間測定

EZH2 滞留時間アッセイ：事前に形成された酵素阻害剤複合体の100倍希釈後の酵素活性の回復（希釈反応）を監視し、それをすべての試薬の同じ最終濃度の未希釈対照の活性と比較（対照反応）することによって、化合物滞留時間を評価した。酵素活性は、³H-SAMをビオチン化H3ペプチドに組み込むことによって測定した。希釈反応では、wt EZH2（社内で調製した五量体複合体）を含有する20nMのPRC2を、1μMの活性化ペプチド（H₂N-RKQLATKAAR（Kme₃）SAPATGGVKKP-アミド）およびそのK_iの600倍の化合物とともに、40μLの緩衝液（50mMのトリス、pH8.5、4mMのDTT、1mMのMgCl₂、0.07mMのBrj-35、および0.1mg/mLのBSA）中で2時間事前にインキュベートし、次いで100倍に希釈し、1μMの活性化ペプチド、5.05μMの基質ペプチド（H₂N-RKQLATKAARKSAPATGGVKKP-NTPEGbiot）、1.01μMのSAM、および1.01μMの³H-SAMを含有する緩衝液138.6μL体積に反応物1.4μLを移すことによって開始した。対照反応用に、0.202nMのPRC2を

、138.6 μLの緩衝液中で2時間、1 μMの活性化ペプチド、1.01 μMのSAM、1.01 μM³のH-SAM、およびそのK_iの6.06倍の化合物とともに事前にインキュベートし、次いで1.4 μLの500 μM基質ペプチドを水に添加することによって反応を開始した。10時間までの様々な時点で、8 μLのアリコート反応容器から1ウェルあたり8 μLのSTOP溶液（50 mMのTris、pH 8.5、200 mMのEDTA、2 mMのSAH）を含有するプレートに移すことによって反応物をクエンチした。最終時点の後、12 μLのクエンチした溶液を、1ウェルあたり40 μLのSTOP溶液を含有するストレプトアビジンでコーティングしたFlashPlate（PerkinElmer）に移し、1～8時間インキュベートし、洗浄し、TopCountプレートリーダー（PerkinElmer）で読み取った。

10

【0124】

カスタムスクリプトを使用して、対照反応の進行状況データを直線および希釈反応の進行状況データにフィッティングした。

【数1】

$$y = v_s t + \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} (1 - e^{-k_{obs} t}) + \text{背景}$$

yが形成された生成物であり、tが反応時間であり、v_iが初期速度であり、v_sが定常状態の速度であり、k_{obs}が曲線の初期速度フェーズから曲線の定常状態の速度フェーズへ移行する速度定数である。希釈反応進行状況データのフィッティングでは、v_sは、対照反応進行状況データにフィッティングした線の傾きに制約した。次いで、k_{obs}のフィッティングした値を滞留時間に変換した。

20

【数2】

$$\tau = \frac{[EI] - \frac{1}{K_i} [E][I]}{k_{obs}[EI]}$$

tが滞留時間であり、K_iが阻害定数であり、[EI]が酵素阻害剤複合体の計算された平衡濃度であり、[E]が遊離酵素の計算された平衡濃度であり、[I]が遊離阻害剤の計算された平衡濃度である。

30

【0125】

MDCKアッセイにおける阻害剤の細胞透過性測定

細胞培養：MDCK II細胞（Netherlands Cancer InstituteのPiet Borstから入手）を、96ウェルBDインサートシステムのポリエチレン膜（PET）上に2.5 x 10⁵細胞/mLで播種し、集密的な細胞単層を形成するまでに4～7日かけた。

【0126】

実験手順：試験および参照化合物（ナドロール、メトプロロール、およびジゴキシン）をストック溶液からの輸送緩衝液（10 mMのHepesを含むHBSS、pH 7.4）で2 μM（<1% DMSO）の濃度に希釈し、細胞単層の頂端部（A）または基底外側（B）に適用した。AからB方向またはBからA方向への試験化合物の透過を、P-gp阻害剤（GF120918、10 μM）で2回測定した。P-gp阻害剤（GF120918、10 μM）あり／なしで、同様にジゴキシンをAからB方向またはBからA方向に10 μMで試験し、ナドロールおよびメトプロロールをP-gp阻害剤（GF120918、10 μM）なしでAからB方向に2 μMで2回試験した。37 ± 1℃、5%のCO₂、飽和湿度のCO₂インキュベーター内で、振盪せずに2.5時間プレートをインキュベートした。加えて、各化合物の流出率も決定した。分析物／ISのピーク面積比に基づくLC／MS／MS分析によって、試験化合物および参照化合物を定量化した。輸送アッセイ

40

50

後、細胞単層の一体性を決定するために、ルシファーイエロー拒絶アッセイを適用する。頂端部チャンバおよび基底外側チャンバの両方から緩衝液を除去し、続いて頂端部チャンバおよび基底外側チャンバそれぞれに、輸送緩衝液中 $100\ \mu\text{M}$ のルシファーイエロー $75\ \mu\text{L}$ 、および $250\ \mu\text{L}$ の輸送緩衝液を添加した。 37°C 、 5% の CO_2 、 95% の相対湿度で、振盪せずにプレートを 30 分間インキュベートする。 30 分のインキュベーション後、 $20\ \mu\text{L}$ のルシファーイエロー試料を頂端部側から採取し、続いて $60\ \mu\text{L}$ の輸送緩衝液を添加する。次いで、 $80\ \mu\text{L}$ のルシファーイエロー試料を基底外側から採取する。ルシファーイエローの相対蛍光単位 (RFU) は、Molecular Device M2e プレートリーダーを用いて $425/528\ \text{nm}$ (励起/発光) で測定する。

【0127】

データ分析：見かけの透過係数 P_{app} ($\text{cm}/\text{秒}$) は、次の等式を使用して計算した。

$$P_{app} = (dC_r / dt) \times V_r / (A \times C_0)$$

式中、 dC_r / dt が、時間と相関するレシーバーチャンバ内の化合物の累積濃度 ($\mu\text{M}/\text{秒}$) であり、 V_r が、レシーバーチャンバ内の溶液体積 (頂端部側で $0.075\ \text{mL}$ 、基底外側で $0.25\ \text{mL}$) であり、 A が、輸送の表面積、すなわち、単層面積 $0.0804\ \text{cm}^2$ であり、 C_0 が、ドナーチャンバ内の初期濃度 (μM) である。

【0128】

流出率は、次の等式を使用して計算した。

$$\text{流出率} = P_{app}(BA) / P_{app}(AB)$$

回復パーセントは、次の等式を使用して計算した。

$$\text{回復率}\% = 100 \times [(V_r \times C_r) + (V_d \times C_d)] / (V_d \times C_0)$$

式中、 V_d が、ドナーチャンバの体積 (頂端部側で $0.075\ \text{mL}$ 、基底外側で $0.25\ \text{mL}$) であり、 C_d および C_r が、それぞれドナーおよびレシーバーチャンバ内の輸送化合物の最終濃度である。

【0129】

基底外側ウェルのルシファーイエローのパーセントは、次の等式を使用して計算する。

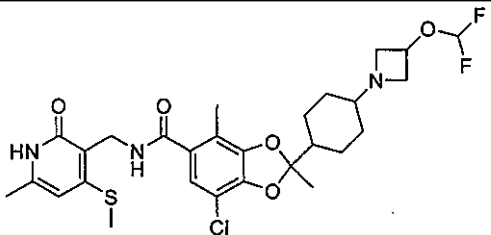
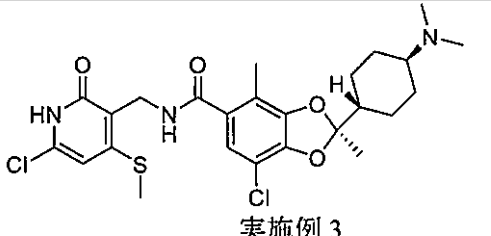
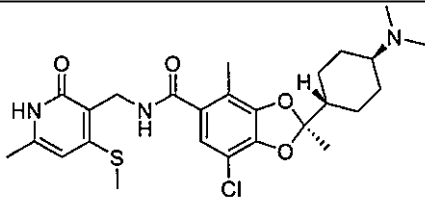
【数3】

$$\text{ルシファーイエロー}\% = \frac{V_{\text{基底外側}} \times \text{RFU}_{\text{基底外側}}}{V_{\text{頂端部}} \times \text{RFU}_{\text{頂端部}} + V_{\text{基底外側}} \times \text{RFU}_{\text{基底外側}}} \times 100$$

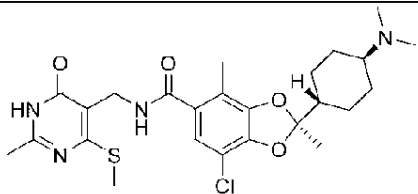
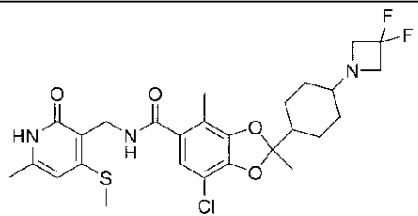
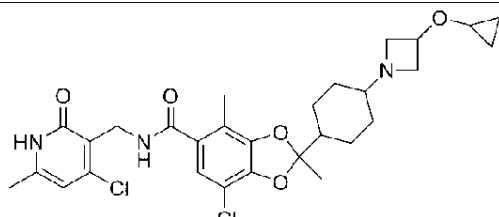
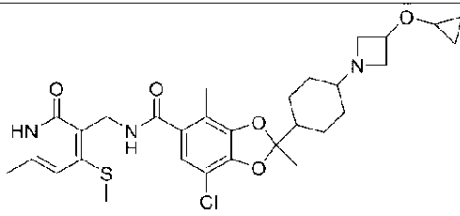
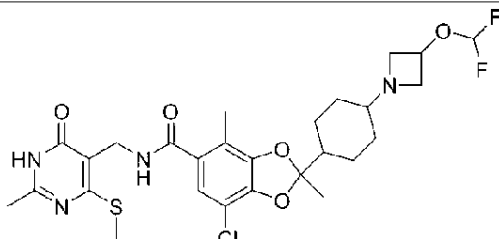
RFU_{頂端部} および RFU_{基底外側} はそれぞれ、頂端部ウェルおよび基底外側ウェルにおけるルシファーイエローの相対蛍光単位値であり、 $V_{\text{頂端部}}$ および $V_{\text{基底外側}}$ はそれぞれ、頂端部および基底外側ウェルの体積 ($0.075\ \text{mL}$ および $0.25\ \text{mL}$) である。ルシファーイエローのパーセントは、2未満であるべきである。データを表6に示す。

【表 6 - 1】

表 6

実施例	EZH2 滞留時間 (時間)	細胞透過性 (10^{-6} cm/秒) / 流出率
 実施例 1 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	>100	5.6/0.79
 実施例 3		3.7/1.2
 実施例 4 (R エナンチオマー、トランス幾何異性体)		0.62/2.3

【表 6 - 2】

 実施例 5 (R エナンチオマー、トランス幾何異性体)		1.1/3.6
 実施例 7-エナンチオマー2 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	33	12/0.71
 実施例 8 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	>100	6.1/0.9
 実施例 9 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	>100	3.8/1.4
 実施例 10 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	37	6.5/0.69

10

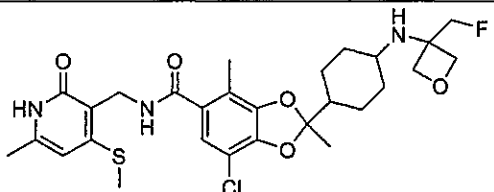
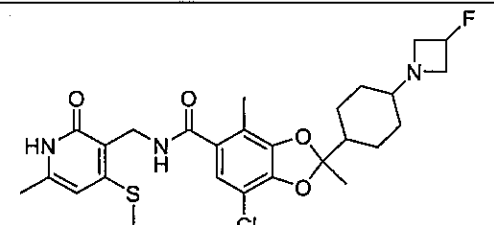
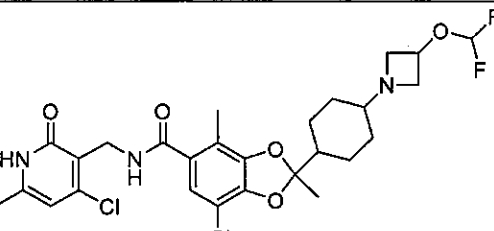
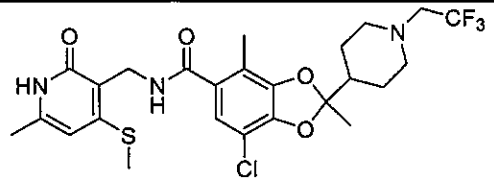
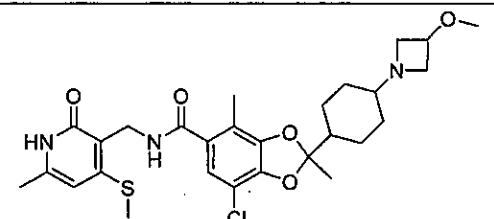
20

30

40

50

【表 6 - 3】

 実施例 11 (単一エナンチオマー、幾何異性体 1)		5.3/1.3
 実施例 12 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	>100	6.3/1.2
 実施例 13 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	48	8.9/0.64
 実施例 14-エナンチオマー-2 (単一エナンチオマー)		13/0.56
 実施例 17 (単一エナンチオマー、単一幾何異性体)	>100	2.5/1.8

【配列表】

0007256823000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

C 0 7 D 405/14 (2006.01)

C 0 7 D 405/14

C 0 7 D 407/14 (2006.01)

C 0 7 D 407/14

弁理士 鶴喰 寿孝

(72)発明者 コテ, アレクサンドル

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139, ケンブリッジ, ブロードウェイ・ストリート 399, アpartment 11

(72)発明者 ゲーリング, ビクター・エス

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02144, サマービル, ウェア・ストリート 10, リア・ユニット

(72)発明者 カンナ, アビナッシュ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02141, ケンブリッジ, ハーレイ・ストリート 63, アpartment 1エル

(72)発明者 モアンヌ, リュディビーヌ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02141, ケンブリッジ, ヨーク・プレイス 15, ナンバー 4

(72)発明者 スタッキー, ジェイコブ・アイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州01701, フレーミングハム, クラウデット・サークル 2

審査官 早川 裕之

(56)参考文献 国際公開第2015/141616 (WO, A1)

カナダ国特許出願公開第3002436 (CA, A1)

特表2015-506985 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 0 7 D 4 0 5 / 1 2

C 0 7 D 4 0 5 / 1 4

C 0 7 D 4 0 7 / 1 4

A 6 1 P 3 5 / 0 0

A 6 1 P 3 5 / 0 2

A 6 1 K 3 1 / 4 5 4 5

A 6 1 K 3 1 / 4 4 3

A 6 1 K 3 1 / 5 0 6

C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)