(19)日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11)国際公開番号
WO2010/143582

発行日　平成24年11月22日(2012.11.22)

(43)国際公開日　平成22年12月16日(2010.12.16)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C07C 235/20	(2006.01)	C07C 235/20	CSPZ	4C206
C07C 237/22	(2006.01)	C07C 237/22	ZNA	4H006
A61K 31/166	(2006.01)	A61K 31/166		
A61K 31/165	(2006.01)	A61K 31/165		
A61P 43/00	(2006.01)	A61P 43/00	111	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 29 頁）　最終頁に続く

出願番号　特願2011-518500 (P2011-518500)
(21)国際出願番号　PCT/JP2010/059476
(22)国際出願日　平成22年6月3日(2010.6.3)
(31)優先権主張番号　特願2009-140553 (P2009-140553)
(32)優先日　平成21年6月11日(2009.6.11)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

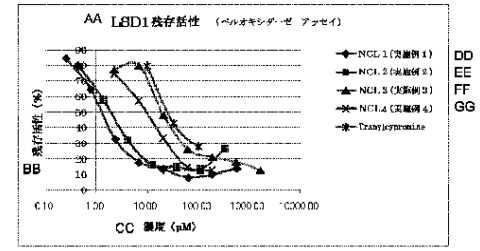
(71)出願人　506218664
公立大学法人名古屋市立大学
愛知県名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄１
(71)出願人　503303466
学校法人関西文理総合学園
滋賀県長浜市田村町１２６６番地
(71)出願人　509165747
株式会社フロンティアファーマ
滋賀県長浜市田村町１２８１番地８
(74)代理人　100118706
弁理士　青山　陽
(72)発明者　宮田　直樹
愛知県名古屋市瑞穂区田辺通３－１　公立大学法人名古屋市立大学内

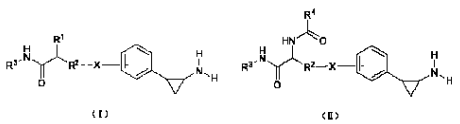
最終頁に続く

(54)【発明の名称】フェニルシクロプロピルアミン誘導体及びＬＳＤ１阻害剤

(57)【要約】
【課題】LSD1の機能を選択的に阻害することのできる化合物及びLSD1阻害剤を提供する。
【解決手段】本発明のフェニルシクロプロピルアミン誘導体は、下記一般式（Ｉ）若しくは（II）（ただし、両式中R^1は水素、置換基が結合していてもよいアルキル基、フェニル基及び複素環基のいずれかを示し、R^2は分枝を有することがあり置換基が結合していてもよいアルキレン基を示し、R^3は置換基が結合していてもよいアルキル基、フェニル基、複素環基及びベンジル基のいずれかを示し、R^4は置換基が結合していてもよいアルキル基、置換基が結合していてもよいフェニル基、置換基が結合していてもよい複素環基、置換基が結合していてもよいアルキルオキシ基、置換基が結合していてもよいフェニルオキシ基、置換基が結合していてもよいアルキルアミノ基及び置換基が結合していてもよいフェニルアミノ基のいずれかを示し、XはO、NH_2、NHCO、CONH、S又はCH_2を示す）の化合物又はその薬学上許容される塩、水和物、溶媒和物若しくはプロドラッグからなることを特徴とする。

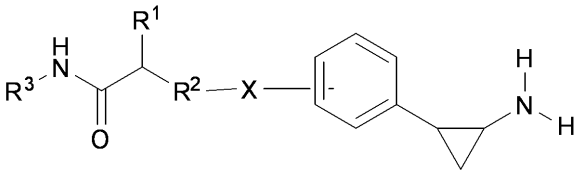
[図1]



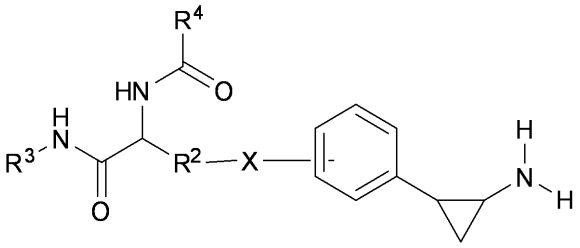


AA RESIDUAL ACTIVITY OF LSD1 (PEROXIDASE ASSAY)
BB RESIDUAL ACTIVITY (%)
CC CONCENTRATION (μM)
DD NCL 1 (EXAMPLE 1)
EE NCL 2 (EXAMPLE 2)
FF NCL 3 (EXAMPLE 3)
GG NCL 4 (EXAMPLE 4)

【特許請求の範囲】
【請求項１】
下記一般式（Ｉ）若しくは（II）（ただし、両式中Ｒ^{1}は水素、置換基が結合していてもよいアルキル基、置換基が結合していてもよいフェニル基及び置換基が結合していてもよい複素環基のいずれかを示し、Ｒ^{2}は分枝を有することがあり置換基が結合していてもよいアルキレン基を示し、Ｒ^{3}は置換基が結合していてもよいアルキル基、置換基が結合していてもよいフェニル基、置換基が結合していてもよい複素環基及び置換基が結合していてもよいベンジル基のいずれかを示し、Ｒ^{4}は置換基が結合していてもよいアルキル基、置換基が結合していてもよいフェニル基、置換基が結合していてもよい複素環基、置換基が結合していてもよいアルキルオキシ基、置換基が結合していてもよいフェニルオキシ基、置換基が結合していてもよいアルキルアミノ基及び置換基が結合していてもよいフェニルアミノ基のいずれかを示し、ＸはＯ、ＮＨ$_{2}$、ＮＨＣＯ、ＣＯＮＨ、Ｓ又はＣＨ$_{2}$を示す）の化合物又はその薬学上許容される塩、水和物、溶媒和物若しくはプロドラッグからなることを特徴とするフェニルシクロプロピルアミン誘導体。
【化１】

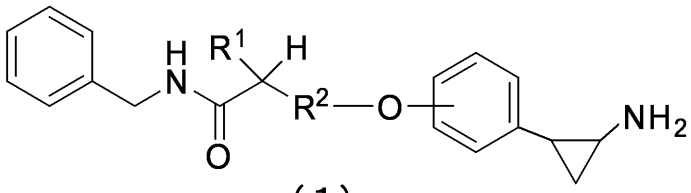


（Ｉ）



（Ⅱ）

【請求項２】
下記一般式（１）（ただし、式中Ｒ^{1}は水素又はフェニルアミド基を示し、Ｒ^{2}は分枝を有することのあるアルキレン基を示し、シクロプロピルアミン置換基はメタ位又はパラ位に結合している）の化合物又はその薬学上許容される塩、水和物、溶媒和物若しくはプロドラッグからなることを特徴とする請求項１記載のフェニルシクロプロピルアミン誘導体。
【化２】



（１）

【請求項３】
Ｒ^{2}はエチレン基であることを特徴とする請求項２記載のフェニルシクロプロピルアミン誘導体。
【請求項４】
Ｒ^{1}はフェニルアミド基であることを特徴とする請求項３に記載のフェニルシクロプロピルアミン誘導体。
【請求項５】
請求項１乃至４のいずれか１項に記載のフェニルシクロプロピルアミン誘導体を有効成分として含有することを特徴とするLSD1阻害剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】

本発明は、LSD1の機能を選択的に阻害することのできるフェニルシクロプロピルアミン誘導体及びそれを用いたLSD1阻害剤に関する。

【背景技術】

【０００２】

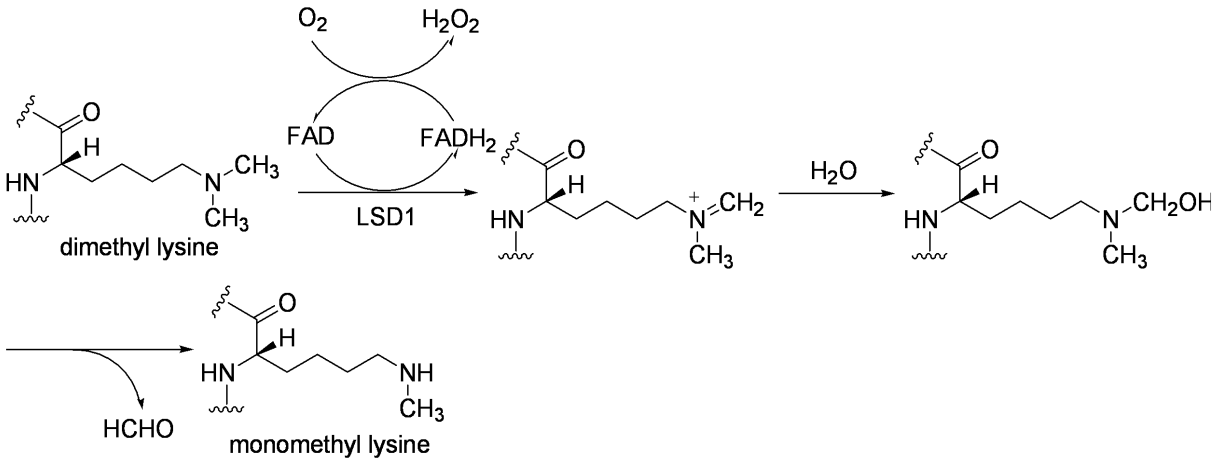
ヒストンは、真核生物においてＤＮＡを折りたたんでクロマチン構造を形成するタンパク質であり、遺伝子の発現に深くかかわっている。すなわち、ヒストンは様々な酵素の働きによって化学修飾され、これによりクロマチン構造が変化し、遺伝子の発現が制御されると考えられている。近年、こうしたエピジェネティックな遺伝子制御に関する様々な知見が発見されている。

【０００３】

Lysine-specific demethylase（以下「LSD1」という）は、最初に発見されたヒストンの脱メチル化酵素であり、ヒストンH3の4番目のリシン残基のモノメチル化体及びジメチル化体(H3K4me1/2)の脱メチル化反応を触媒し、ホルムアルデヒドを副生する（非特許文献１参照）。また、LSD1は補酵素の一種であるフラビンアデニンジヌクレオチド（以下「ＦＡＤ」という）と複合体をつくり、ＦＡＤが酸化還元のメディエーターとなって、酸素によるリジン残基の酸化が進行する（下記反応式参照）。

【０００４】

【化１】



【０００５】

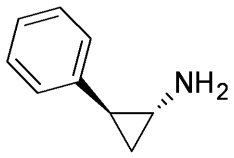
一方、LSD1は前立腺がんにおいて過剰発現しており、アンドロゲン受容体（AR）と相互作用してAR依存性の転写を活性化することが明らかになっている。また、LSD1をノックダウンすると、アンドロゲンによって誘発された転写活性化が抑制され、細胞増殖が阻害されるということが報告されている（非特許文献２）。しかし、現在の段階ではLSD1が生体にどのような影響を与えるかなど、生物学的意義に関して不明な点が多い。このため、LSD1の触媒作用を阻害する物質（すなわちLSD1阻害剤）を見つければ、これをLSD1の機能を調べるためのバイオプローブとして用いたり、抗がん剤として応用したりすることが期待できる。

【０００６】

しかしながら、現在までに活性が強くて、LSD1の機能を選択的に阻害する低分子量化合物は知られていない。これまでに報告されたLSD1を阻害する低分子量の化合物として、トラニルシプロミン（tranylcypromine）（ａ）やその誘導体が挙げられる（非特許文献１）。

【０００７】

【化２】



（ａ）

【０００８】

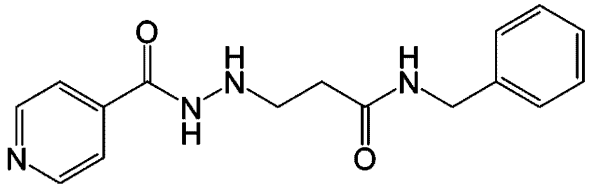
しかし、トラニルシプロミン（ａ）はLSD1阻害活性が弱い(ａ;IC50=21μM)という問題があった。また、LSD1はアミンオキシダーゼファミリーに属しており、ポリアミノオキシダーゼ（ＰＡＯ）やモノアミノオキシダーゼ（MAO）との相同性が高いために、トラニルシプロミン（ａ）やこれまで知られているトラニルシプロミン誘導体はMAO-AやMAO-Bをも阻害してしまい、選択的にLSD1を阻害することができないという欠点があった。

【０００９】

トラニルシプロミン（ａ）及びその誘導体以外のLSD1阻害剤として、下記に示すニアラミド（Nialamide）（ｂ）も知られているが、この化合物もMAO阻害剤との選択性はない（非特許文献１）。

【００１０】

【化３】



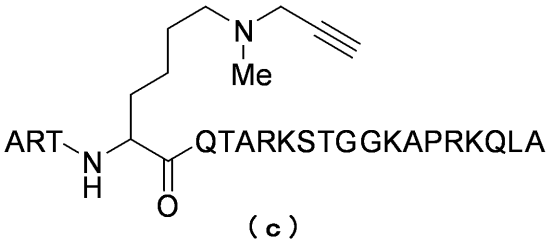
（ｂ）

【００１１】

一方、触媒メカニズムを基に設計された下記化合物（ｃ）はLSD1に選択的な阻害薬ではあるが、ペプチド化合物であり、極性が高くて分子量も大きいため、細胞膜を通らないという問題がある（非特許文献３）。

【００１２】

【化４】



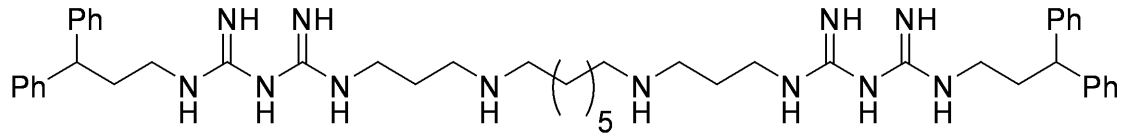
（ｃ）

【００１３】

また、特許文献１には、下記ポリアミン化合物（ｄ）がLSD1の阻害剤として機能することが記載されている。しかしながら、MAO阻害剤との選択性については何ら言及されていない。また、ポリアミン化合物（ｄ）は成長因子に関わるタンパク質合成や細胞内濃度調節機構に関与するなど、様々な生理活性を持つとされているので、LSD1選択的阻害薬として有用ではない。

【００１４】

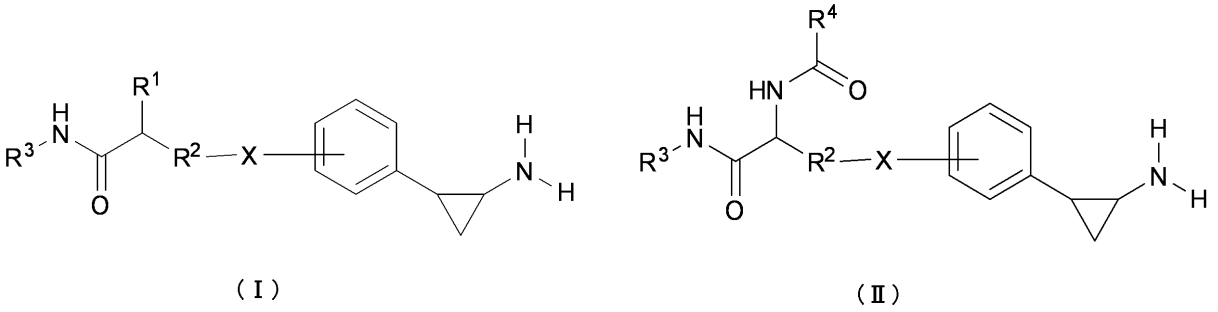
【化５】



（ｄ）

【先行技術文献】
【特許文献】
【００１５】
【特許文献１】ＷＯ２００７／０２１８３９
【非特許文献】
【００１６】
【非特許文献１】Biochemistry 2007, 46, 4408-4416
【非特許文献２】Nature 2005, 437, 436-439
【非特許文献３】J.AM.CHEM.SOC.2006,128, 4536-4537
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１７】
本発明は、上記従来の実情に鑑みてなされたものであり、LSD1の機能を選択的に阻害することのできる化合物及びLSD1阻害剤を提供することを解決すべき課題としている。
【課題を解決するための手段】
【００１８】
本発明者らは、トラニルシプロミンがLSD1の機能を阻害することに注目し、さらにその選択性を高めるべく、トラニルシプロミンの各種誘導体を合成し、そのLSD1阻害効果、MAO阻害効果、癌増殖抑制効果等について鋭意研究を重ねた。その結果、上記課題を解決可能な化合物を発見し、本発明を完成するに至った。
【００１９】
すなわち、本発明のフェニルシクロプロピルアミン誘導体は、下記一般式（Ｉ）若しくは（II）（ただし、両式中R^1は水素、置換基が結合していてもよいアルキル基、置換基が結合していてもよいフェニル基及び置換基が結合していてもよい複素環基のいずれかを示し、R^2は分枝を有することがあり置換基が結合していてもよいアルキレン基を示し、R^3は置換基が結合していてもよいアルキル基、置換基が結合していてもよいフェニル基、置換基が結合していてもよい複素環基及び置換基が結合していてもよいベンジル基のいずれかを示し、R^4は置換基が結合していてもよいアルキル基、置換基が結合していてもよいフェニル基、置換基が結合していてもよい複素環基、置換基が結合していてもよいアルキルオキシ基、置換基が結合していてもよいフェニルオキシ基、置換基が結合していてもよいアルキルアミノ基及び置換基が結合していてもよいフェニルアミノ基のいずれかを示し、ＸはＯ、NH_2、ＮＨＣＯ、ＣＯＮＨ、Ｓ又はCH_2を示す）の化合物、又はその薬学上許容される塩、水和物、溶媒和物若しくはプロドラッグからなること特徴とする。

【化６】



（Ｉ）　　（Ⅱ）

【００２０】

本発明者らの試験結果によれば、上記本発明のフェニルシクロプロピルアミン誘導体（I）及び（II）は、LSD1の阻害活性が高く、MAO-AやMAO-Bなどの阻害作用は、LSD1阻害作用に比べて小さい。すなわち、選択的にLSD1阻害を起こすことができる。このため、LSD1の機能を調べるための生物学的ツールとして好適に用いることができる。また、癌細胞増殖抑制作用も有しており、抗がん剤として利用することも期待される。

【００２１】

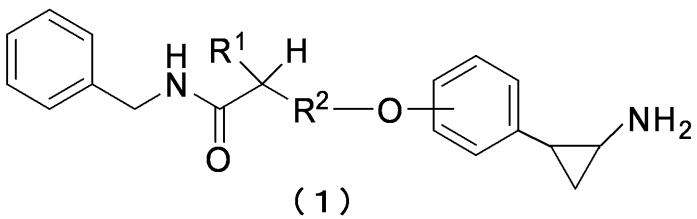
なお、「プロドラッグ」とは、生体内で加水分解されてフェニルシクロプロピルアミン誘導体（I）又は（II）を再生する化合物をいい、例えばアミノ基の水素をアルカノイル基（アシル基）に置換した誘導体（すなわちアミド化した誘導体）、ヘミアミナールエーテル誘導体、アルコキシカルボニルオキシメチル基に置換した誘導体、N-オキシド誘導体等が挙げられる。

また、薬学上許容される塩としては、また、薬学上許容される塩としては、例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、硝酸塩等の無機酸塩、ギ酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、マロン酸塩、シュウ酸塩、グリコール酸塩、フタル酸塩、ベンゼンスルホン酸塩等の有機酸塩が挙げられる。また、これらの塩を組み合わせて用いることもできる。

【００２２】

上記本発明のフェニルシクロプロピルアミン誘導体（I）又は（II）の中でも、下記一般式（１）（ただし、式中R^1は水素又はフェニルアミド基を示し、R^2は分枝を有することのあるアルキレン基を示し、シクロプロピルアミン置換基はメタ位又はパラ位に結合している）の化合物又はその薬学上許容される塩、水和物、溶媒和物若しくはプロドラッグからなることを特徴とするフェニルシクロプロピルアミン誘導体が好ましい。

【化７】



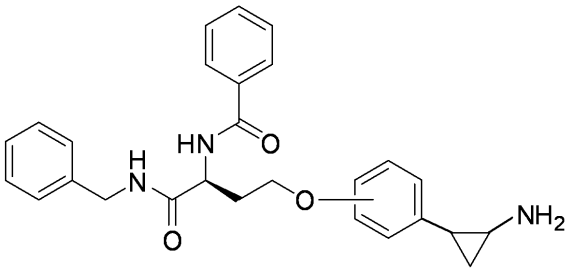
（１）

【００２３】

また、R^2はエチレン基とすることが特に好ましい。さらに好ましいのは、下記構造式（２）に示す、フェニルアミド基を有するフェニルシクロプロピルアミン誘導体（２）又はその薬学上許容される塩、水和物、溶媒和物若しくはプロドラッグからなることである。本発明者らの試験結果によれば、この化合物は特にLSD1阻害活性が大きく、MAO阻害との選択性にも優れている。

【００２４】

【化８】



(2)

【発明を実施するための形態】

【００２５】

以下、本発明を具体化した実施例について詳細に説明する。

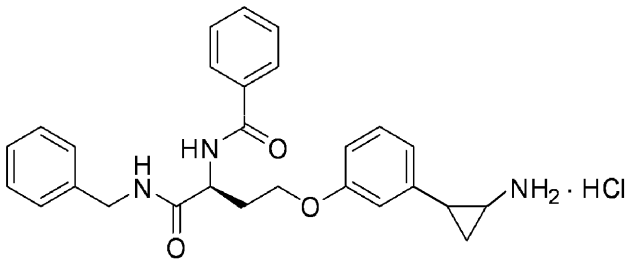
【００２６】

（実施例１）

実施例１では、(S)-トランス-N-3-[3-(2-アミノシクロプロピル) フェノキシ]-1-ベンジルカルバモイルプロピルベンズアミド塩酸塩（NCL-1）を合成した（下記化学式参照）。詳細は以下のとおりである。

【００２７】

【化９】

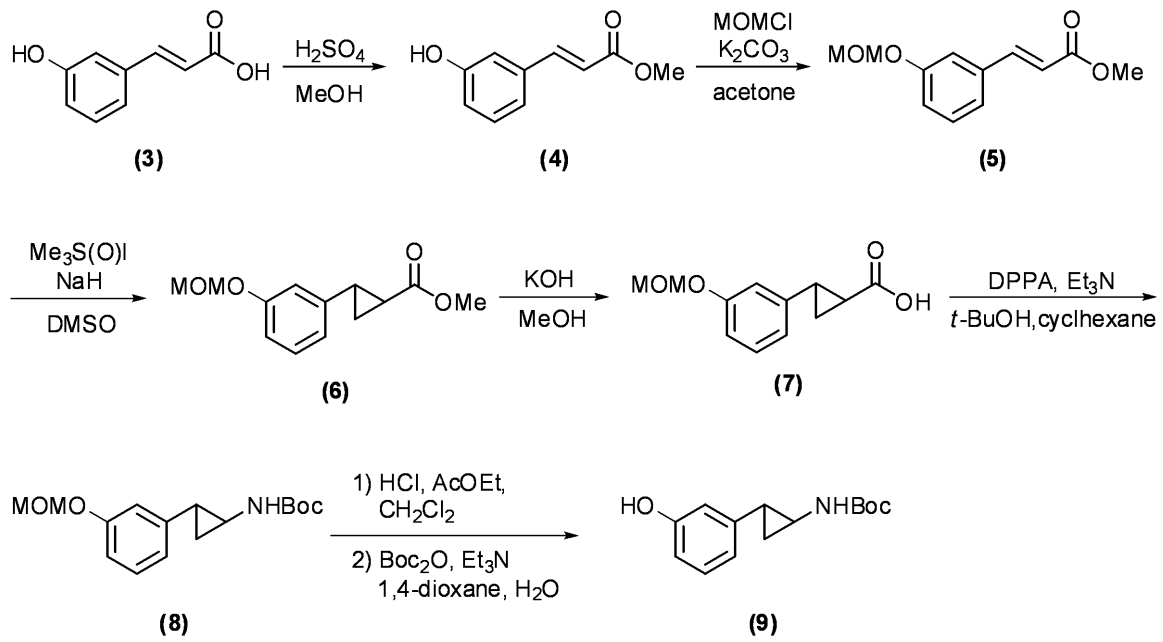


NCL-1

【００２８】

まず、NCL-1を合成するための一方の前駆体として、化合物（９）を以下の反応ルートにしたがって合成した。

【化１０】



【００２９】

以下に合成法の詳細を示す。

（ステップ１－１）

トランス-3-(3-ヒドロキシフェニル)アクリル酸メチルエステル（４）の合成

3-(3-ヒドロキシフェニル)アクリル酸（３）（25.0 g）をメタノール（82 mL）に溶解し、濃硫酸（2.0 mL）を加え、24時間還流した。反応液を濃縮し、残査を酢酸エチル（1000 mL）に溶解させ、水（500 mL）、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液（500 mL）で洗浄した。有機層を飽和食塩水（500 mL）で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、減圧濃縮し、化合物（４）（25.9 g，収率96%）を白色固体として得た。化合物（４）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.60 (1H, d, J = 15.8 Hz), 7.21 (1H, t, J = 8.0 Hz), 7.04 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.98 (1H, t, J =1.8 Hz), 6.82 (1H,dd, J =8.0, 1.8Hz), 6.44 (1H, d, J =15.8 Hz), 3.77 (3H, s).

【００３０】

（ステップ１－２）

トランス-3-(3メトキシメトキシフェニル)アクリル酸メチルエステル（５）の合成

ステップ１－１で得られたトランス-3-(3-ヒドロキシフェニル)アクリル酸メチルエステル（４）（25.8 g）をアセトン（220 mL）に溶解し、炭酸カリウム（40.0 g）を加え、室温で20分攪拌した。その溶液にメトキシメチルクロリド（11 mL）をゆっくりと加え、室温で12時間攪拌した。炭酸カリウムをろ過後、ろ液を濃縮し、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（展開溶媒　n-ヘキサン：酢酸エチル＝10 ：1）で精製し、化合物（５）（27.2 g，収率84%）を無色の油状物として得た。化合物（５）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.66 (1H, d, J = 16.2 Hz), 7.30 (1H, t, J = 8.0 Hz), 7.20 (1H, s), 7.17 (1H, d, J = 8.0 Hz), 7.07 (1H, dd, J = 8.0, 2.4 Hz), 6.43 (1H, d, J = 16.0 Hz), 5.19 (2H, s), 3.81 (3H, s), 3.49 (3H, s).

【００３１】

（ステップ１－３）

トランス-2-(3-メトキシメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸メチルエステル（６）の合成

水素化ナトリウム（60%）（6.32 g）とトリメチルスルホニウムヨージド（34.8 g）の混合物に、ジメチルスルホキシド（137 mL）を室温でゆっくりと滴下した。その反応液を室温で1時間攪拌した後、ステップ１－３で得られたトランス-3-(3メトキシメトキシフェニル)アクリル酸メチルエステル（５）（27.0 g）のジメチルスルホキシド（137 mL）溶液を滴下した。反応液を室温で4時間攪拌した後、10%クエン酸水溶液（500 mL）を加え、酢酸エチル（500 mL）で抽出した。有機層を飽和食塩水（500 mL）で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、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（展開溶媒　n-ヘキサン：酢酸エチル＝10 ：1）で精製し、化合物（６）（6.70 g，収率23%）を無色の油状物として得た。化合物（６）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.19 (1H, t, J = 8.0 Hz), 6.89 (1H, dd, J =8.0, 2.5 Hz), 6.78 (1H, t, J = 2.5 Hz), 6.74 (1H, d, J =8.0 Hz), 5.16 (2H, s), 3.71 (3H, s), 3.47 (3H, s), 2.51-2.49 (1H, m), 1.92-1.89 (1H, m), 1.61-1.57 (1H, m) 1.34-1.31 (1H, m).

【００３２】

（ステップ１－４）

トランス-2-(3-メトキシメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸（７）の合成

ステップ１－３で得られたトランス-2-(3-メトキシメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸メチルエステル（６）（6.70 g）をメタノール（56 mL）に溶解させ、氷冷下、水酸化カリウム（16.0 g）のメタノール溶液（130 mL）を加え、反応液を室温で15時間攪拌した。反応液を濃縮し、残査を水（100 mL）に懸濁させ、ジクロロメタン（100 mL）で洗浄した。水層に2N塩酸を加えて酸性（pH 1）にし、ジクロロメタン（300 mL）で抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、減圧濃縮し、化合物（７）（6.00 g，収率95%）を無色の油状物として得た。化合物（７）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.20 (1H, t, J = 8.0 Hz), 6.90 (1H, dd, J = 8.0, 1.9 Hz), 6.79 (1H, t, J = 1.9 Hz), 6.75 (1H, d, J = 8.0 Hz), 5.16 (2H, s), 3.48 (3H, s), 2.60-2.56 (1H, m), 1.92-1.89 (1H, m), 1.65 (1H, quintet, J = 5.0 Hz)1.42-1.38 (1H, m).

【００３３】

（ステップ１－５）

トランス- 2-(3-メトキシメトキシフェニル)シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（８）の合成

ステップ１－４で得られたトランス-2-(3-メトキシメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸（７）（6.00 g）をシクロヘキサン（320 mL）に溶解させ、ジフェニルホスホリルアジド（6.7 mL）とトリエチルアミン（4.5 mL）をアルゴン雰囲気下、0 ℃で加えた。反応液を3時間還流後、tert-ブタノール（52 mL）を加え、さらに11時間還流した。反応液を濃縮後、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（展開溶媒　n-ヘキサン：酢酸エチル＝ 7 ：1）で精製し、化合物（８）（3.70 g，収率47%）を白色固体として得た。化合物（７）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.17 (1H, t, J = 8.0 Hz), 6.85 (1H, d, J = 9.2 Hz), 6.78 (1H, s), 6.76 (1H, s), 5.15 (2H, s),4.82 (1H, broad s), 3.47 (3H, s)2.72-2.76 (1H, m), 1.98-2.02 (1H, m), 1.45 (9H, s), 1.74-1.16 (2H, m).

【００３４】

（ステップ１－６）

トランス-2-(3-ヒドロキシフェニル)シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（９）の合成

ステップ１－５で得られたトランス-2-(3-メトキシメトキシフェニル)シクロプロピルt

ert-ブチルカルバメート（８）（3.70 g）をジクロロメタン（60 mL）に溶解させ、4N塩酸酢酸エチル溶液（68 mL）を加え、室温で4時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣を1,4-ジオキサン（33 mL） と水 (33 mL)に溶解させ、トリエチルアミン (20 mL) と Boc2O (4.6 mL)を加えた。反応液を室温で12時間攪拌後、10%クエン酸溶液（200 mL）に注ぎ、酢酸エチル（300 mL）で抽出した。有機層を飽和食塩水（300 mL）で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、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（展開溶媒 n-ヘキサン：酢酸エチル＝ 5 ：1）で精製し、化合物（９）（1.59 g, 収率35%）を無色の油状物として得た。化合物（９）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

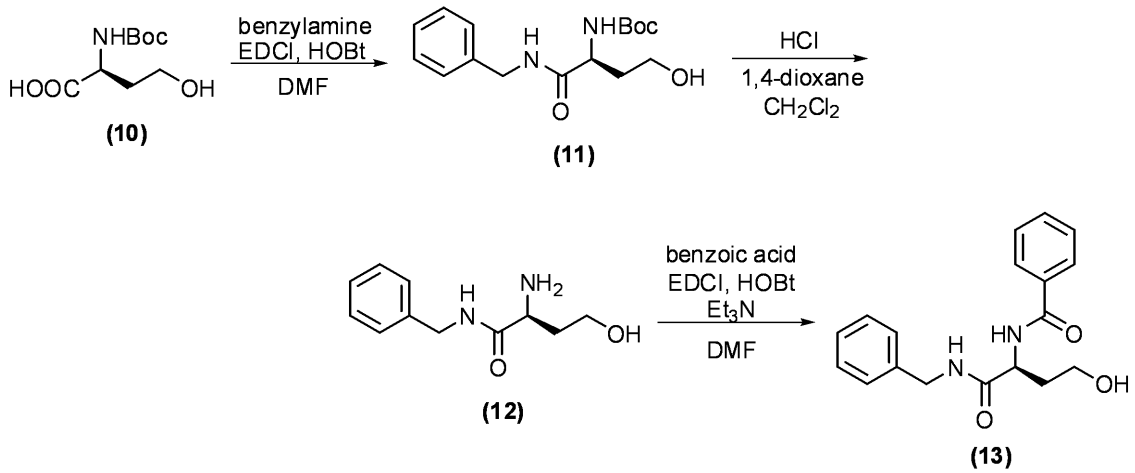
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.10 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.67 (1H, d, J =8.0 Hz), 6.64 (1H, dd, J = 8.0, 2.4 Hz), 6.59 (1H, s), 5.28 (1H, broad s), 4.86 (1H, broad s), 2.69-2.72 (1H, m), 1.97-2.01 (1H, m), 1.46 (9H, s), 1.15-1.12 (2H, m).

【００３５】

さらに、NCL-1を合成するための他方の前駆体として、化合物（１３）を以下の反応ルートにしたがって合成した。

【化１１】



【００３６】

以下に合成法の詳細を示す。

（ステップ１－７）

(S)-1-ベンジルカルバモイル-3-ヒドロキシプロピルtert-ブチルカルバメート（１１）の合成

N- tert-ブトキシカルボニル(S) -ホモセリン（１０）（5.50 g）、ベンジルアミン（2.8 mL）、PyBOP（13.1 g）、トリエチルアミン（7.0 mL）をN,N-ジメチルホルムアミド（55 mL）に溶解させ、室温で10時間攪拌した。反応液を水（300 mL）で希釈し、クロロホルム（300 mL）で抽出した。有機層を飽和食塩水（300 mL）で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、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（展開溶媒 n-ヘキサン：酢酸エチル＝ １ ：2）で精製し、化合物（１１）（5.46 g, 収率70%）を白色固体として得た。化合物（１１）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.35-7.32 (2H, m), 7.29-7.25 (3H, m), 6.71 (1H, broad s), 5.58 (1H, d, J = 7.3 Hz), 4.45 (2H, s), 4.35 (1H, s), 3.71 (2H, s), 3.27 (1H, broad s), 2.04-1.98 (1H, m), 1.72-1.85 (1H, m), 1.43 (9H, s)

【００３７】

（ステップ１－８）

(S)-2-アミノ-N-ベンジル-4-ヒドロキシブタンアミド塩酸塩（１２）の合成

ステップ１－７で得られた(S)-1-ベンジルカルバモイル-3-ヒドロキシプロピルtert-ブ

チルカルバメート（１１）（5.40 g）をジクロロメタン（60 mL）に溶解させ、4N塩酸1,4-ジオキサン溶液（87 mL）を加え、室温で5時間撹拌した。反応液を濃縮し、化合物（4.27 g，収率100%）を白色固体として得た。化合物（１２）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

d：^{1}H NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm)
7.44-7.41 (2H, m), 7.34-7.30 (3H, m), 7.27 (1H, broad s), 4.43 (2H, s), 3.94 (1H, d, J = 7.0 Hz) 2.03 (2H, s)

【００３８】

（ステップ１－９）

(S)-N-(1-ベンジルカルバモイル-3-ヒドロキシプロピル)ベンズアミド（１３）の合成

ステップ１－８で得られた(S)-2-アミノ-N-ベンジル-4-ヒドロキシブタンアミド塩酸塩（１２）（118 mg）、安息香酸（60 mg）、PyBOP（303 mg）、トリエチルアミン（0.2 mL）をN,N-ジメチルホルムアミド（1 mL）に溶解させ、室温で20時間撹拌した。反応液を水（100 mL）で希釈し、ジクロロメタン（100 mL）で抽出した。有機層を飽和食塩水（100 mL）で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、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（展開溶媒　n-ヘキサン：酢酸エチル＝2：3）で精製し、化合物（１３）（72 mg，収率47%）を白色固体として得た。化合物（１３）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

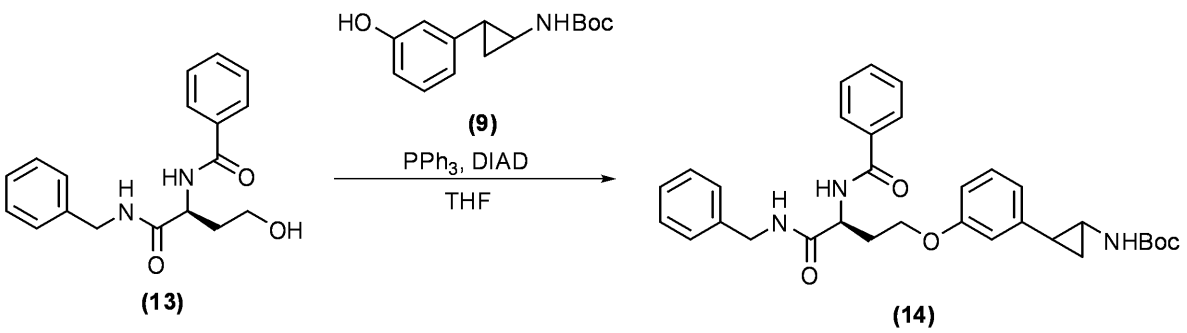
^{1}H NMR (CDCl3, 500 MHz, d; ppm)
d：7.79 (2H, d, J = 7.3 Hz), 7.53 (1H, t, J = 7.3 Hz), 7.44 (2H, t, J = 8.0 Hz), 7.33-7.25 (5H, m), 7.06 (1H, d, J = 7.3 Hz), 6.89 (1H, broad s), 4.77 (1H, q, J = 6.4 Hz), 4.47-4.45 (2H, m), 4.32-4.28 (1H, m), 4.22-4.18 (1H, m), 2.28-2.19 (2H, m), 2.03 (3H, s).

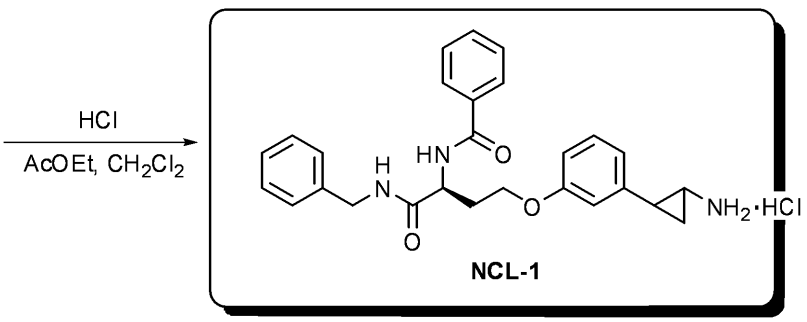
【００３９】

<カップリング反応>

ステップ１－１～ステップ１－６で合成したカップリング前駆体である化合物（９）と、ステップ１－７～ステップ１－９で合成したカップリング前駆体（１３）とを用いて、化１１に示す合成ルートに従い、光延反応を用いたカップリング反応を行った。

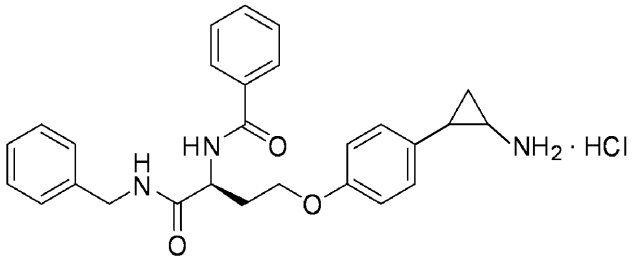
【化１２】





【００４０】
以下にカップリング反応の詳細を示す。
（ステップ１－１０）
(S)-トランス-[2-[3-(3-ベンゾイルアミノ-3-ベンジルカルバモイルプロポキシ)フェニル] シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（１４）の合成
ステップ１－９で得られた(S)-N-(1-ベンジルカルバモイル-3-ヒドロキシプロピル)ベンズアミド（１３）（200 mg）と、ステップ１－６で得られたトランス-2-(3-ヒドロキシフェニル)シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（９）（230 mg）と、トリフェニルホスフィン（504 mg）とを無水テトラヒドロフラン（3 mL）に溶解させ、氷冷下、ジイソプロピルアゾジカルボキシレート（1mL）を加えた。反応液を室温で5時間攪拌後、濃縮し、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（展開溶媒 n-ヘキサン：酢酸エチル＝１：1）で精製し、化合物（１４）（64 mg，収率18%）を淡黄色固体として得た。化合物（１４）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。
^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)
d：7.82 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.52 (1H, t, J = 8.5 Hz), 7.46 (2H, t, J = 8.5 Hz), 7.26-7.21 (5H, m), 7.16 (1H, t, J = 8.0 Hz), 6.92 (1H, s), 6.75 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.63 (1H, d, J = 8.0 Hz), 6.60 (1H, broad s), 4.88 (1H, quartet, J = 6.0 Hz), 4.47 (2H, d, J = 6.0 Hz), 4.32-4.29 (1H, m), 4.13-4.10 (1H, m), 2.65-2.70 (1H, m), 2.43-2.37 (2H, m), 1.99-1.97 (1H, m), 1.45 (9H, s), 1.14-1.10 (2H, m).
【００４１】
（ステップ１－１１）
(S)-トランス-N-3-[3-(2-アミノシクロプロピル) フェノキシ]-1-ベンジルカルバモイルプロピルベンズアミド塩酸塩（NCL-1）の合成
ステップ１－１０で得られた(S)-トランス-[2-[3-(3-ベンゾイルアミノ-3-ベンジルカルバモイルプロポキシ)フェニル] シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（１４）（70 mg）をジクロロメタン（1 mL）に溶解させ、4N塩酸酢酸エチル溶液（0.8 mL）を加え、室温で4時間攪拌した。反応液を濃縮し、残渣をクロロホルム-メタノールから再結晶し、実施例１の化合物（NCL-1）（22 mg，収率36%）を淡黄色固体として得た。NCL-1の融点、^{1}H NMR、^{13}C NMR、MS (FAB)のデータを示す。
融点 134.8-139.1 ℃
^{1}H NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm)
d：7.84 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.54 (1H, t, J = 8.5 Hz), 7.46 (2H, t, J = 8.5 Hz), 7.26-7.17 (6H, m), 6.77 (1H, dd, J = 8.0, 1.5 Hz), 6.74-6.72 (1H, m), 6.67 (1H, d, J = 1.5 Hz), 4.47-4.37 (2H, m), 4.08 (2H, t, J = 6.0 Hz), 2.28-2.24 (2H, m), 1.35-1.33 (1H, m), 1.29-1.26 (1H, m)
^{13}C NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm)
d：173.93, 170.34, 160.52, 141.32, 139.79, 135.21, 132.96, 130.81, 129.55, 128.54, 128.46, 128.19, 120.00, 114.15, 114.05, 113.84, 65.92, 53.13, 44.15, 32.68, 31.96, 22.58, 13.84
MS (FAB) m/z = 444 (M^+)
Anal. Calcd. for $C27H30ClN_3O_3$ 3/2H_2O: C, 63.96; H, 6.56; N, 8.29.
Found: C, 63.83; H, 6.29; N, 7.98. 3/2
【００４２】
（実施例２）
実施例２では、(S)-トランス-N-3-[4-(2-アミノシクロプロピル)フェノキシ]-1-ベンジルカルバモイルプロピルベンズアミド塩酸塩（NCL-2）を合成した（下記化学式参照）。詳細は以下のとおりである。
【００４３】

【化１３】



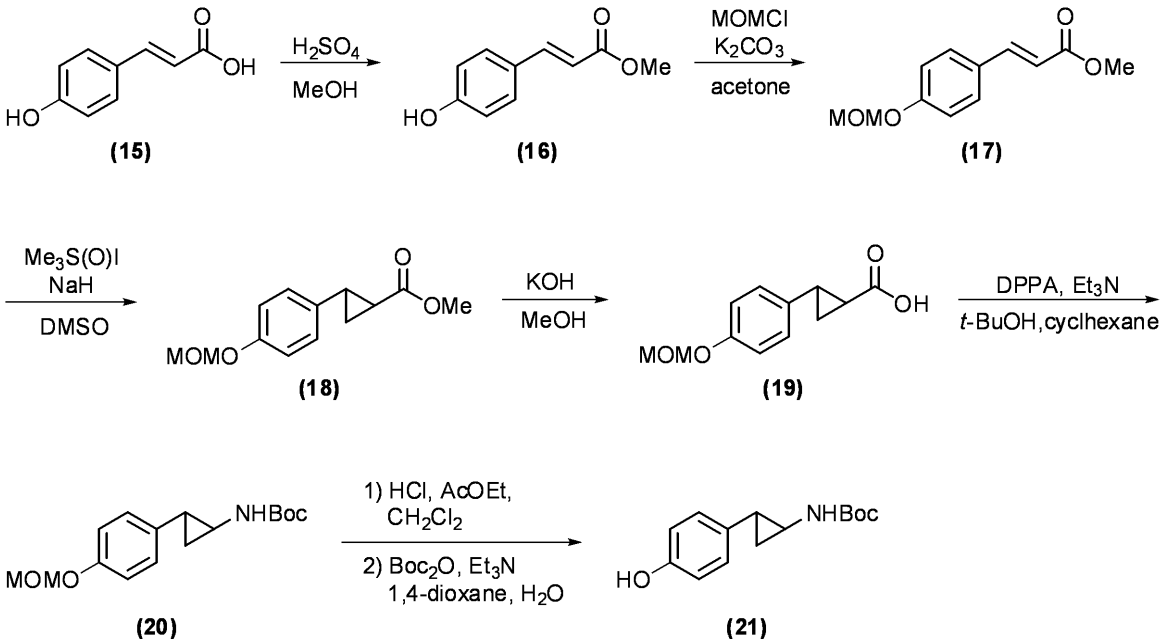
NCL-2

【００４４】

まず、NCL-2を合成するための一方の前駆体として、化合物（２１）を以下の反応ルートにしたがって合成した。

【００４５】

【化１４】



【００４６】

以下に合成法の詳細を示す。

（ステップ２－１）

トランス-3-(4-ヒドロキシフェニル)アクリル酸メチルエステル（１６）の合成

実施例１のステップ１－１と同様の方法により、3-(4-ヒドロキシフェニル)アクリル酸（１５）（20.0 g）を出発原料とし、化合物（１６）（21.2 g，収率99%）を白色固体として得た。化合物（１６）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR (CDCl3, 500 MHz, d; ppm)

d：7.64 (1H, d, J = 15.8 Hz), 7.43 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.84 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.31 (1H, d, J =15.8 Hz), 5.21 (1H,s), 3.80 (3H, s).

【００４７】

（ステップ２－２）

トランス-3-(4-メトキシメトキシフェニル)アクリル酸メチルエステル（１７）の合成

実施例１のステップ１－２と同様の方法により、ステップ２－１より得られたトランス-3-(4-ヒドロキシフェニル)アクリル酸メチルエステル（１６）（10.0 g）より、化合物

（１７）（11.1 g，収率89%）を無色油状物として得た。化合物（１７）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。
^{1}H NMR (CDCl3, 500 MHz, d; ppm)
d：7.65 (1H, d, J = 6.2 Hz), 7.47 (2H, d, J = 8.8 Hz), 7.04 (2H, d, J = 8.8 Hz), 6.33 (1H, d, J = 6.2 Hz), 5.20 (2H, s), 3.80 (3H, s), 3.48 (3H, s).

【００４８】

（ステップ２－３）

トランス-2-(4-メトキシメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸メチルエステル（１８）の合成

実施例１のステップ１－３と同様の方法により、ステップ２－２より得られたトランス-3-(4-メトキシメトキシフェニル)アクリル酸メチルエステル（１５）（11.0 g）より、化合物（１８）（1.68 g，収率14%）を無色油状物として得た。化合物（１８）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。
^{1}H NMR (CDCl3, 500 MHz, d; ppm)
d：7.03 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.95 (2H, d, J =8.5 Hz), 5.14 (2H, s), 3.71 (3H, s), 3.46 (3H, s), 2.51-2.47 (1H, m), 1.85-1.81 (1H, m), 1.58-1.54 (1H, m) 1.29-1.25 (1H, m).

【００４９】

（ステップ２－４）

トランス-2-(4-メトキシメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸（１９）の合成

実施例１のステップ１－４と同様の方法により、ステップ２－３より得られたトランス-2-(4-メトキシメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸メチルエステル（１８）（1.68 g）より、化合物（１９）（1.50 g，収率95%）を白色固体として得た。化合物（１９）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。
^{1}H NMR (CDCl3, 500 MHz, d; ppm)
d：7.05 (2H, d, J = 6.7 Hz), 6.94 (2H, d, J = 6.7 Hz), 5.12 (2H, s), 3.42 (3H, s), 2.43-2.39 (1H, m), 1.76-1.73 (1H, m), 1.49-1.46 (1H, m), 1.33-1.28 (1H, m).

【００５０】

（ステップ２－５）

トランス- 2-(4-メトキシメトキシフェニル)シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（２０）の合成

実施例１のステップ１－５と同様の方法により、ステップ２－４より得られたトランス-2-(4-メトキシメトキシフェニル)シクロプロパンカルボン酸（１９）（1.05 g）より、化合物（２０）（788 mg，収率56%）を淡黄色固体として得た。化合物（２０）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。
^{1}H NMR (CDCl3, 500 MHz, d; ppm)
d：7.07 (2H, d, J = 8.2 Hz), 6.94 (2H, d, J = 8.2 Hz), 5.13 (2H, s), 4.89 (1H, broad s), 3.46 (3H, s), 2.64-2.69 (1H, m), 2.02-1.98 (1H, m), 1.46 (9H, s), 1.12-1.09 (2H, m).

【００５１】

（ステップ２－６）

トランス-2-(4-ヒドロキシフェニル)シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（２１）の合成

実施例１のステップ１－６と同様の方法により、ステップ２－５より得られたトランス- 2-(4-メトキシメトキシフェニル)シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（２０）（476 mg）より、化合物（２１）（300 mg，収率74%）を淡黄色油状物として得た。化合物（２１）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。
^{1}H NMR (CDCl3, 500 MHz, d; ppm)
d：6.94 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.72 (2H, d, J =8.5 Hz), 5.13 (1H, broad s), 4.84 (1H, broad s), 2.60-2.70 (1H, m), 1.98 (1H, m), 2.09-1.96 (1H, m), 1.10-1.05 (2H,

m).

【００５２】

NCL-2を合成するための他方の前駆体として、実施例１のステップ１－７～ステップ１－９で合成した化合物（１３）を用いた。

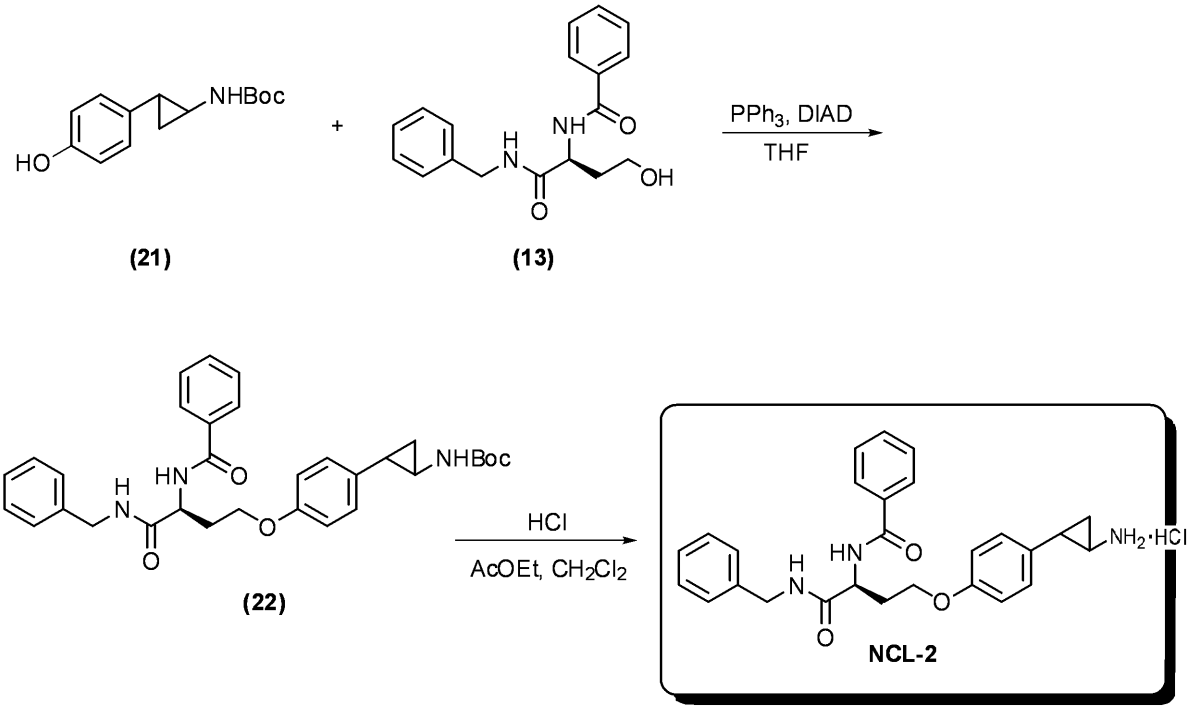
【００５３】

<カップリング反応>

上記ステップ２－１～ステップ２－６で合成したカップリング前駆体である化合物（２１）と、化合物（１３）とを用いて、光延反応によるたカップリング反応によって、実施例２の化合物NCL-2を合成した。

【００５４】

【化１５】



【００５５】

以下に合成法の詳細を示す。

（ステップ２－７）

(S)-トランス-[2-[4-(3-ベンゾイルアミノ-3-ベンジルカルバモイルプロポキシ)フェニル] シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（２２）の合成

実施例１のステップ１－７と同様の方法により、ステップ２－６より得られたトランス-2-(4-ヒドロキシフェニル)シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（２１）（220 mg）と

実施例１のステップ１－７～１－９で合成したカップリング前駆体（１３）のカップリングを行い、化合物（２２）（83 mg, 収率25%）を淡黄色固体として得た。化合物（２２）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.79 (2H, d, J = 8.5 Hz), 7.53-7.49 (1H, m), 7.41 (2H, t, J = 8.5 Hz), 7.26-7.13 (5H, m), 7.04 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.71 (2H, d, J = 8.5 Hz), 4.94-4.89 (2H, m), 4.46-4.38 (2H, m), 4.25-4.21 (1H, m), 4.08-4.04 (1H, m), 2.55-2.59 (1H, m), 2.43-2.37 (2H, m), 1.95-2.01 (1H, m), 1.45 (9H, s), 1.08 (2H, t, J = 7.0 Hz).

【００５６】

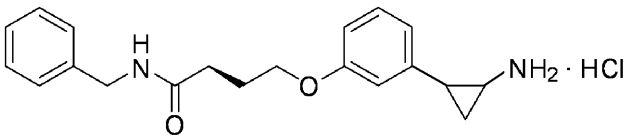
（ステップ２－８）

(S)-トランス-N-3-[4-(2-アミノシクロプロピル) フェノキシ]-1-ベンジルカルバモイル

プロピルベンズアミド塩酸塩（NCL-2）の合成
実施例１のステップ１－１１と同様の方法により、ステップ２－７より得られた、(S)-トランス-[2-[4-(3-ベンゾイルアミノ-3-ベンジルカルバモイルプロポキシ)フェニル] シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（２２）（83 mg）より、化合物（NCL-2）（18 mg, 収率25%）を淡黄色固体として得た。NCL-2の融点、^{1}H NMR、^{13}C NMR、MS (FAB)のデータを示す。
融点：141.2-144.5 ℃
^{1}H NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm)
d：7.83 (2H, d, J = 7.0 Hz), 7.54 (1H, t, J = 7.0 Hz), 7.45 (2H, t, J = 7.0 Hz), 7.27-7.19 (6H, m), 7.05 (2H, dd, J = 9.0 Hz), 6.84 (2H, d, J = 9.0 Hz), 4.40 (2H, d, J = 8.0 Hz), 4.06 (2H, t, J = 8.0 Hz), 2.74-2.72 (1H, m), 2.42-2.36 (1H, m), 2.29-2.21 (1H, m), 1.34-1.29 (1H, m), 1.26-1.22 (1H, m)
^{13}C NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm)
d：173.91, 170.32, 159.23, 139.80, 135.21, 132.93, 131.84, 129.55, 129.52, 128.62, 128.52, 128.48, 128.17, 115.89, 65.95, 53.13, 44.16, 32.70, 31.73, 21.96, 13.41
MS (FAB) m/z = 444 (M^{+});
Anal. Calcd For $C27H_{30}ClN_3O_3$ $2H_2O$: C, 62.84; H, 6.64; N, 8.14.
Found: C, 62.47; H, 6.08; N, 8.21.

【００５７】
（実施例３）
実施例３では、トランス-4-[3-(2-アミノシクロプロピル)フェノキシ]-N-ベンジルブチルアミド塩酸塩（NCL-3）を合成した（下記化学式参照）。詳細は以下のとおりである。

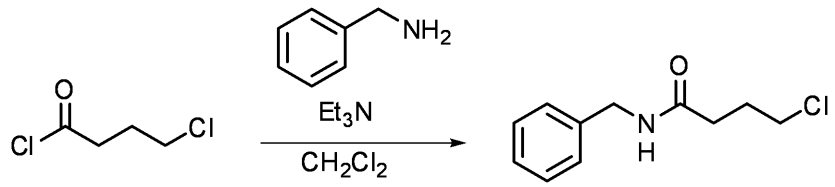
【００５８】
【化１６】



NCL-3

【００５９】
<カップリング前駆体>
実施例３では、NCL-3を合成するための前駆体として、実施例１（ステップ１－１～１－６）で合成した、化合物（９）を用いた。また、NCL-3を合成するためのもう一方の前駆体として、化合物（２４）を次の反応によって合成した。

【化１７】



(23) (24)

【００６０】
（ステップ３－１）
N-ベンジル-4-クロロブチルアミド（２４）の合成
ベンジルアミン（1.1 mL）とトリエチルアミン（4.5 mL）をジクロロメタン（26 mL）に溶解し、氷冷下、4-クロロブチリルクロリド（２３）（1.5 mL）のジクロロメタン（15

mL）溶液を滴下した。0°Cで30分攪拌後、反応液を水（100 mL）に注ぎ、酢酸エチル（200 mL）で抽出した。有機層を飽和食塩水（100 mL）で洗浄して、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、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（展開溶媒 n-ヘキサン：酢酸エチル＝ 3 ：1）で精製し、化合物（２４）（1.26 g, 収率59%）を淡黄色油状物として得た。化合物（２４）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.36-7.26 (5H, m), 5.84 (1H, broad s), 4.44 (2H, d, J = 5.8 Hz), 3.62 (2H, t, J = 6.0 Hz), 2.40 (2H, t, J = 7.0 Hz), 2.14 (2H, quintet, J = 7.0 Hz).

【００６１】

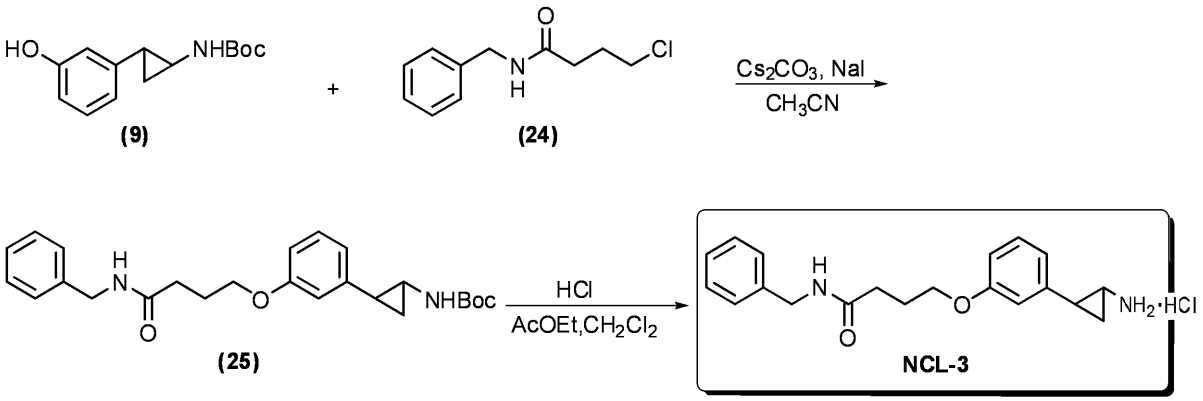
NCL-3を合成するための他方の前駆体として、実施例１のステップ１－１～ステップ１－６で合成した化合物（９）を用いた。

【００６２】

<カップリング反応>

上記のようにして合成した化合物（２４）と化合物（９）とを光延反応によってカップリングさせて実施例３の化合物NCL-3を得た。

【化１８】



【００６３】

以下に合成法の詳細を示す。

（ステップ３－２）

トランス-2-[3-(3-ベンジルカルバモイルプロポキシ)フェニル]シクロプロピル tert-ブチルカルバメート（２５）の合成

実施例1のステップ１－６で得られたトランス-2-(3-ヒドロキシフェニル)シクロプロピルtert-ブチルカルバメート（９）（400 mg）をアセトニトリル（7.5 mL）に溶解させ、炭酸セシウム（1.54 g）、ヨウ化ナトリウム（70 mg）を加えて、室温で15分間攪拌した。反応液にステップ３－１で得られたN-ベンジル-4-クロロブチルアミド（２５）（900 mg）のアセトニトリル（10 mL）溶液を添加し、9時間加熱還流した。反応液をろ過し、不溶物を取り除き、ろ液を濃縮後、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（展開溶媒 n-ヘキサン：酢酸エチル＝ 1：1）で精製し、化合物（２４）（140 mg, 収率21%）を淡黄色油状物として得た。化合物（２５）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.30-7.24 (5H, m), 7.15 (1H, t, J = 7.0 Hz), 6.71 (1H, d, J = 7.0 Hz), 6.66 (1H, d, J = 7.0 Hz), 6.62 (1H, s), 5.85 (1H, broad s), 4.84 (1H, broad s), 4.44 (2H, d, J = 5.8 Hz), 3.99 (2H, t, J = 5.8 Hz), 2.67-2.75 (1H, m), 2.43 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.16-2.13 (2H, m), 2.01-1.96 (1H, m), 1.45 (9H, s), 1.12-1.15 (2H, m).

【００６４】

（ステップ３－３）

トランス-4-[3-(2-アミノシクロプロピル)フェノキシ]-N-ベンジルブチルアミド塩酸塩（NCL-3）の合成

実施例１のステップ１－１１と同様の方法により、ステップ３－２より得られた、トランス-2-[3-(3-ベンジルカルバモイルプロポキシ)フェニル]シクロプロピル tert-ブチルカルバメート（２５）（140 mg）より、実施例３のフェニルシクロプロピルアミン誘導体である化合物（NCL-3）（82 mg, 収率69%）を白色固体として得た。NCL-3の融点、^{1}H NMR、^{13}C NMR、MS (ELC)のデータを示す。

融点：83.3-86.7 °C

^{1}H NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm)

d：7.26-7.17 (6H, m), 6.77 (1H, dd, J = 7.6, 2.5 Hz), 6.72 (1H, d, J = 7.6 Hz), 6.69 (1H, s), 4.36 (2H, s), 3.98 (2H, t, J = 6.4 Hz), 2.82-2.80 (1H, m), 2.43 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.32-2.30 (1H, m), 2.10-2.06 (2H, m), 1.39-1.35 (1H, m), 1.32-1.28 (1H, m)

^{13}C NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm)

d：175.37, 160.71, 141.30, 140.02, 130.78, 129.53, 128.52, 128.18, 119.68, 113.94 113.81, 68.06, 33.46, 31.96, 26.57, 22.62, 13.84

MS (ELC) m/z: 325 (M^{+})

Anal. Calcd For $C_{20}H_{25}ClN_2O_2$ 2/3H_2O: C, 64.42; H, 7.12; N, 7.51.

Found: C, 64.44; H, 6.87; N, 7.80.

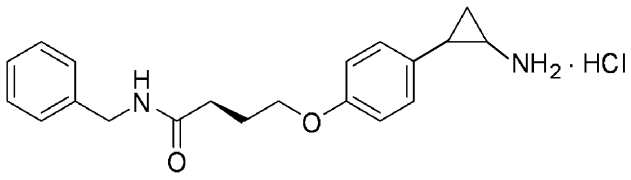
【００６５】

（実施例４）

実施例４では、トランス-4-[4-(2-アミノシクロプロピル)フェノキシ]-N-ベンジルブチルアミド塩酸塩（NCL-4）を合成した（下記化学式参照）。詳細は以下のとおりである。

【００６６】

【化１９】



NCL-4

【００６７】

<カップリング前駆体>

実施例４では、カップリング前駆体は、実施例２におけるステップ２－１～ステップ２－６で合成した、化合物（２１）を用いた。また、もう一方のカップリング前駆体としては、実施例３におけるステップ３－１で合成した化合物（２４）を用いた。

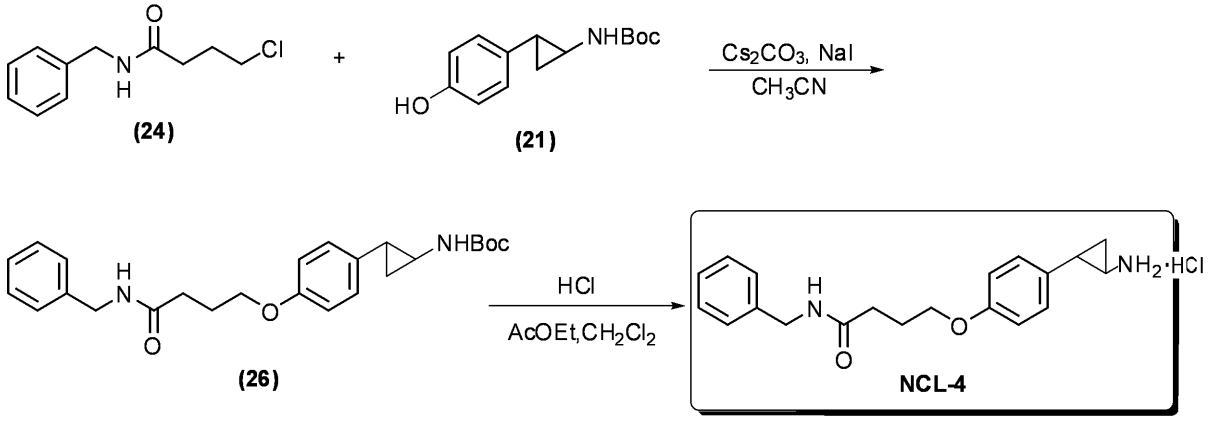
【００６８】

<カップリング反応>

上記のようにして合成した化合物（２４）と化合物（２１）とを光延反応によってカップリングさせて実施例４の化合物NCL-4を得た。

【００６９】

【化２０】



【００７０】

以下に合成法の詳細を示す。

（ステップ４－１）

トランス-2-[4-(3-ベンジルカルバモイルプロポキシ)フェニル]シクロプロピル tert-ブチルカルバメート（２６）の合成

実施例３のステップ３－２と同様の方法により、化合物（２１）（500 mg）と化合物（２４）とをカップリングさせ、実施例４のフェニルシクロプロピルアミン誘導体である化合物（２６）（NCL-3）（82 mg, 収率69%）を白色固体として得た。化合物（２６）の^{1}H NMRのデータを以下に示す。

^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500 MHz, d; ppm)

d：7.32-7.24 (5H, m), 7.05 (2H, d, J = 8.2 Hz), 6.75 (2H, d, J = 8.2 Hz), 5.82 (1H, broad s), 4.84 (1H, broad s), 4.44 (2H, d, J = 5.8 Hz), 3.97 (2H, t, J = 5.8 Hz), 2.60-2.70 (1H, m), 2.42 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.16-2.12 (2H, m), 1.97-2.04 (1H, m), 1.46 (9H, s), 1.02-1.15 (2H, m).

【００７１】

（ステップ４－２）

トランス-4-[4-(2-アミノシクロプロピル)フェノキシ]-N-ベンジルブチルアミド塩酸塩（NCL-4）の合成

実施例１のステップ１－１１と同様の方法により、ステップ４－１より得られた、化合物（２６）（140 mg）より、実施例４のフェニルシクロプロピルアミン誘導体である化合物（NCL-4）（82 mg, 収率69%）を白色固体として得た。NCL-4の融点、^{1}H NMR、^{13}C NMR、MS (ELC)のデータを示す。

融点：156.3-159.4 °C; ^{1}H NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm)

d：7.27-7.21 (5H, m), 7.06 (2H, d, J = 8.5 Hz), 6.83 (2H, d, J = 8.5 Hz), 4.35 (2H, s), 3.95 (2H, t, J = 6.4 Hz), 2.75-2.74 (1H, m), 2.42 (2H, t, J = 7.2 Hz), 2.30-2.27 (1H, m), 2.09-2.05 (2H, m), 1.35-1.32 (1H, m), 1.27-1.24 (1H, m)

d：^{13}C NMR (CD3OD, 500 MHz, d; ppm) 175.34, 159.44, 140.06, 131.58, 129.51, 128.61, 128.53, 128.16, 115.81, 68.17, 44.11, 33.48, 31.73, 26.59, 21.96, 13.40

MS (ELC) m/z: 325 (M^+)

Anal. Calcd For $C_{20}H_{25}ClN_2O_2$ H_2O: C, 63.40; H, 7.18; N, 7.39.

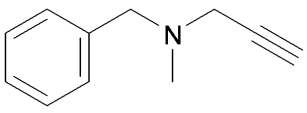
Found: C, 63.50; H, 6.68; N, 7.44.

【００７２】

－評　　価－

以上のようにして得られた実施例１～実施例４の化合物（NCL-1～NCL-4）について、LSD1阻害活性試験、モノアミンオキシダーゼ阻害活性試験及びHeLa細胞増殖阻害試験を行った。

【００７３】
＜LSD1阻害試験＞
LSD1酵素は以下のようにして調製した。
全長のLSD1（1-851aa）のN末端にヒスチジン5残基を付加した組換えタンパク質をコードするプラスミドを調製し、このプラスミドで形質転換した組換え大腸菌を用いてLSD1を発現させた。その後、組換え大腸菌を超音波処理で溶解し、その可溶性画分をHisTrapクロマトグラフィーで精製し、LSD1酵素溶液を得た。LSD1の酵素活性は、LSD1の脱メチル化反応の際に生成する過酸化水素をペルオキシダーゼと試薬によって発色させ、吸光光度法で定量することにより測定した。すなわち、384ウエルマイクロタイタープレート内で、50mM Hepes-NaOH buffer（pH7.5）、0.1mM 4-アミノアンチピリン、1mM 3,5-ジクロロ-2-ヒドロキシベンゼンスルホン酸、20μM histone H3- lysine 4 dimethyl peptide、0.05μM LSD1、0.35μM horseradish peroxidaseからなる20μlの溶液を25℃で30分間、経時的に酵素反応を測定した。測定にはSpectra Max M2e(Molecular Devices社)を用いて、生成物の515nmでの吸光度を測定して求めた。また、阻害活性については、ジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide）添加時の酵素活性を100%とし、フェニルシクロプロピルアミン誘導体の添加濃度を様々に変えて残存活性を測定し、50％の活性を阻害する濃度（IC_{50}）を求めた。
【００７４】
LSD1阻害試験の結果を図１に示す。この図に示すように、実施例１～４の化合物（NCL-1～４）は、いずれもtranylcypromineより高いLSD1阻害活性を示した。また、実施例１～４のの化合物（NCL-1～４）中でも、アミノ酸構造を有する実施例１のNCL-1及び実施例２のNCL-2では、極めて高いLSD1阻害活性を示した。
【００７５】
＜モノアミンオキシダーゼ阻害活性測定試験＞
モノアミンオキシダーゼA（MAO-A）及びモノアミンオキシダーゼB（MAO-B）阻害活性の測定を、Promega社のMAO-Gloアッセイキットと Sigma-Aldrich社から購入したMAO-AおよびMAO-Bを用いて以下のように行った。
12.5 μLの4倍MAO基質（最終濃度40 μM）、12.5 μLの4倍阻害剤溶液（最終濃度0.1~1000 μM）、25 μLのMAO-A（最終濃度 9 unit/mL）あるいは25 μLのMAO-B（最終濃度2.3 unit/mL）を混合し、室温で1時間反応させた。この反応液に50 μLのルシフェリン検出試薬を添加し、室温で20分反応させ、蛍光プレートリーダーも用いて蛍光強度（蛍光測定波長：562 nm）を測定し、IC_{50}値（酵素を50%阻害する阻害剤濃度）を求めた。
【００７６】
MAO-Aに対する阻害活性の結果を図２に示す。この図に示すように、実施例１～４の化合物（NCL-1～４）は、いずれもtranylcypromineやpargylineより低いMAO A阻害活性を示した。その中でも、アミノ酸構造を有する実施例１のNCL-1及び実施例２のNCL-2では、特に阻害活性が低かった。
また、MAO-Bに対する阻害活性についても、図３に示すように、実施例１～４の化合物（NCL-1～４）は、いずれもtranylcypromineやpargyline（下記化学式参照）より低いMAO-B阻害活性を示し、その中でも、実施例１のNCL-1及び実施例２のNCL-2では、特に阻害活性が低かった。
【００７７】
【化２１】



pargyline

【００７８】
＜がん細胞増殖阻害＞

（１）HeLa細胞の増殖に対する阻害活性の測定

上記実施例１～４の化合物（NCL-1～４）について、ヒト子宮頸がん由来細胞株であるHeLa細胞の増殖に対する化合物の阻害活性を測定することにより評価した。以下にその詳細を示す。

【００７９】

細胞増殖阻害活性は、3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide（MTT）アッセイ法により求めた。このアッセイ法は、生きた細胞のミトコンドリアに含まれるＮＡＤＨがＭＴＴと反応して発色するときの吸光度を測定して、ＮＡＤＨの量を測定することを原理とするものであり、以下の手順で行った。

96ウエルマイクロタイタープレートにHeLa細胞を１ウエルあたり100μlの10%ウシ胎児血清含有RPMI1640培地に5000細胞ずつ播種し、CO_2インキュベーターで24時間培養した後、化合物を添加した。48時間培養後、5mg/mlのMTT液を１ウエルあたり10μl入れ、CO_2インキュベーターでさらに3時間培養した。可溶化溶液(0.04mol/l 塩酸-イソプロパノール)を１ウエルあたり100μl入れて激しくボルテックス後、Fusion-aFP（PerkinElmer社製）で560nmの吸光度を測定し、細胞の生存量を求めた。また、阻害活性は、ジメチルスルホキシド（dimethyl sulfoxide）添加時の酵素活性を100%とし、フェニルシクロプロピルアミン誘導体の添加濃度を様々に変えて残存活性を測定し、50％の活性を阻害する濃度（IC_{50}）を求めた。

【００８０】

HeLa細胞増殖に対する阻害活性の結果を図４に示す。この図から、実施例１～４の化合物（NCL-1～４）は、いずれもtranylcypromineよりも高い阻害活性を示し、特に実施例１（NCL-1）及び実施例４（NCL-4）において、顕著な増殖阻害活性を示すことが分かった。

【００８１】

LSD1阻害活性試験、モノアミンオキシダーゼ阻害活性試験及びHeLa細胞増殖阻害試験を行った結果をまとめて表１に示す。この表から、実施例１～４の化合物（NCL-1～NCL-4）のLSD1に対するIC_{50}は、MAO-Aに対するIC_{50}よりも小さく、特に実施例１（NCL-1）及び実施例２（NCL-2）では、LSD1阻害活性についての選択性に極めて優れていることが分かった。また、実施例１の化合物（NCL-1）及び実施例２の化合物（NCL-2）では、MAO-Bに対しても、優れた選択性を有していることが分かった。こうしたLSD1に対する優れた選択性は、実施例１（NCL-1）及び実施例２（NCL-2）が有しているアミノ酸構造に起因するものと推定される。

また、HeLa細胞の細胞増殖に対するGI_{50}の値は、実施例１～４の化合物（NCL-1～４）のいずれの化合物も、tranylcypromineより遥かに低く、細胞増殖抑制効果が高いことが分かった。

【００８２】

【表１】

化合物	IC_{50} (μM)			選択性		GI_{50} (μM)
	LSD1	MAO A	MAO B	MAO A / LSD1	MAO B / LSD1	
NCL1(実施例１)	2.49	129	326	51.9	131	12.5
NCL2(実施例２)	1.92	137	>1000	71.4	>500	29.8
NCL3(実施例３)	21.9	51.3	6.79	2.34	0.310	29.0
NCL4(実施例４)	9.65	13.9	6.47	1.45	0.671	14.7
tranylcypromine	32.0	2.60	1.50	0.0810	0.047	>500
pargyline	-	2.96	0.628	-	-	-

【００８３】

（２）HeLa細胞以外のがん細胞に対するの増殖に対する阻害活性の測定

また、実施例１～４の化合物（NCL-1～４）について、ヒト大腸がん由来細胞株であるH

CT116、ヒト前立腺がん由来細胞株であるPC-3、ヒト食道がん由来細胞株であるKYSE150、及びヒト神経芽腫由来細胞株であるSH-SY5Yの増殖に対する阻害活性についても、HeLa細胞の場合と同様のMTTアッセイ法により求めた。

【００８４】

HCT116、PC-3、KYSE150及びSH-SY5Yの増殖に対する阻害活性の測定結果を図５～図８に示す。これらの図から、実施例１～４の化合物（NCL-1～４）は、いずれのがん細胞に対しても、tranylcypromineよりも高い阻害活性を示すことが分かった。

【００８５】

また、HeLa細胞、HCT116細胞、PC-3細胞、KYSE150細胞及びSH-SY5Y細胞増殖に対して実施例１～４の化合物（NCL-1～４）及びtranylcypromineを添加した時のGI_{50}を表２に示す。この表から、実施例１～４の化合物（NCL-1～４）は、いずれの細胞に対してもtranylcypromineより遥かにGI_{50}の値が低いことが分かる。

【００８６】

【表２】

GI_{50} values (μM)

cell		tranylcypromine	NCL-1	NCL-2	NCL-3	NCL-4
HeLa	cervix cancer	>500	13	30	29	15
HCT116	colon cancer	>1000	43	67	71	16
PC-3	prostate cancer	600	6.0	17	10	13
KYSE150	esophagus cancer	260	11	18	15	5.9
SH-SY5Y	neuroblastoma	500	27	43	71	7.5

【００８７】

この発明は上記発明の実施の態様及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【００８８】

【図１】LSD1に対する阻害活性を示す図である。

【図２】MAO-Aに対する阻害活性を示す図である。

【図３】MAO-Bに対する阻害活性を示す図である。

【図４】HeLa細胞増殖に対する阻害活性を示す図である。

【図５】HCT116細胞増殖に対する阻害活性を示す図である。

【図６】PC-3細胞増殖に対する阻害活性を示す図である。

【図７】KYSE150細胞増殖に対する阻害活性を示す図である。

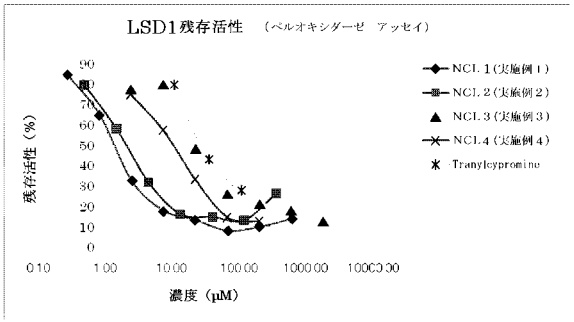
【図８】SH-SY5Y細胞増殖に対する阻害活性を示す図である。

【産業上の利用可能性】

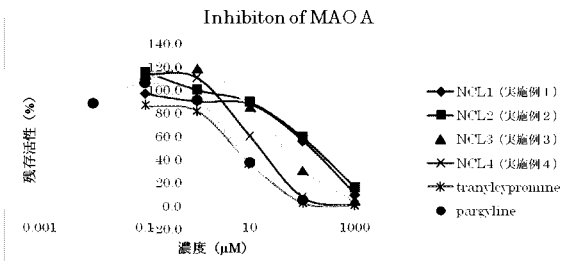
【００８９】

本発明のフェニルシクロプロピルアミン誘導体及びLSD1阻害剤は、LSD1の機能を調べるための生物学的ツールとして用いたり、抗がん剤として用いたりすることができると期待される。

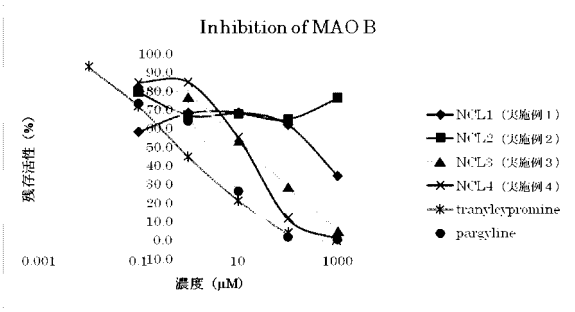
【図１】



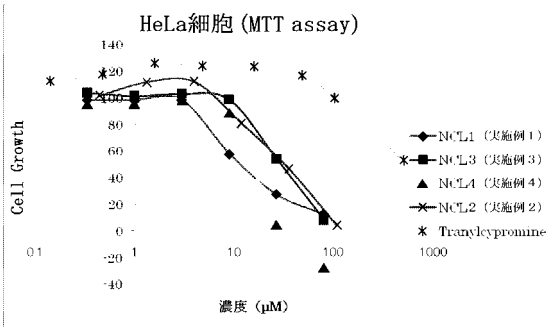
【図２】



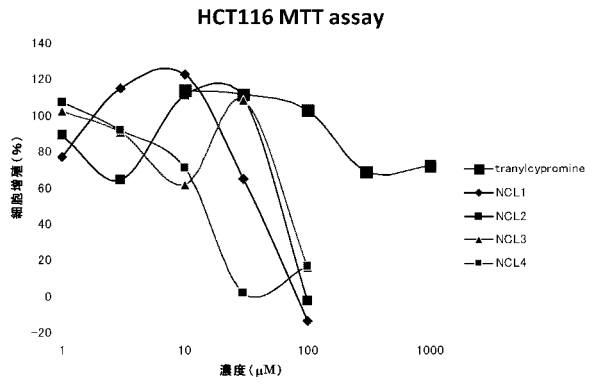
【図３】



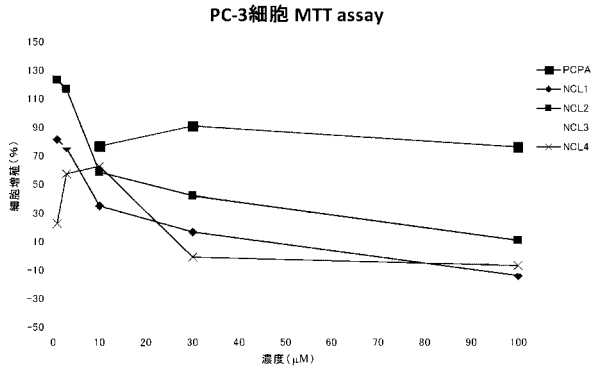
【図４】



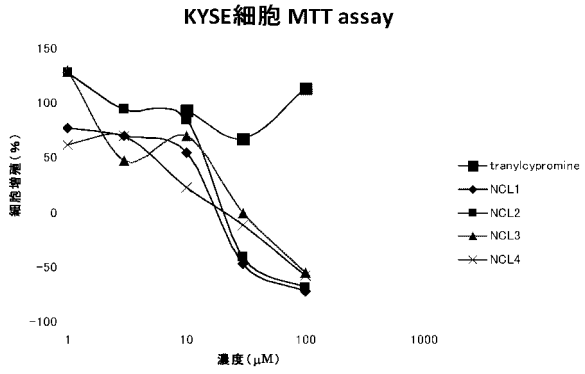
【図５】



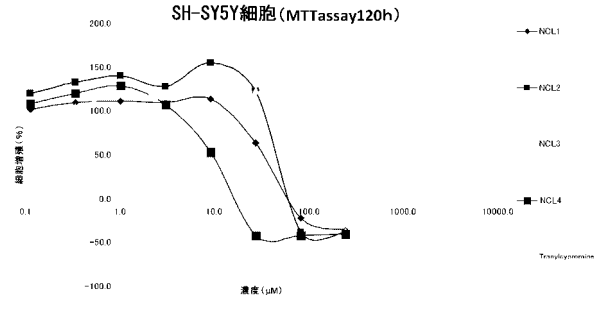
【図６】



【図７】



【図８】



【配列表】
2010143582000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/059476

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07C235/20(2006.01)i, *A61K31/165*(2006.01)i, *A61K31/166*(2006.01)i, *A61P35/00*(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i, *C07C237/22*(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)
C07C235/20, C07C237/22

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 1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHMIDT, D.M.Z. et al., trans-2-Phenylcyclopropylamine Is a Mechanism-Based Inactivator of the Histone Demethylase LSD1, Biochemistry, Vol.46, No.14, p.4408-4416 (2007).	1-5
A	TCHILIBON, S. et al., Exploring distal regions of the A_3 adenosine receptor binding site: sterically constrained N^6-(2-phenylethyl) adenosine derivatives as potent ligands, Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol.12, No.9, p.2021-2034 (2004).	1-5

☒ 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
05 August, 2010 (05.08.10)	17 August, 2010 (17.08.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2010/059476

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	UEDA, R. et al., Identification of Cell-Active Lysine Specific Demethylase 1-Selective Inhibitors, Journal of the American Chemical Society, Vol.131, No.48, p.17536-17537 (2009). Published on Web: 2009.11.16	1-5
P,A	BINDA, C. et al., Biochemical, Structural, and Biological Evaluation of Tranylcypromine Derivatives as Inhibitors of Histone Demethylases LSD1 and LSD2, Journal of the American Chemical Society, Vol.132, No.19, p.6827-6833 (2010). Published on Web: 2010.04.23	1-5

国際調査報告

国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５９４７６

Ａ． 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl. C07C235/20(2006.01)i, A61K31/165(2006.01)i, A61K31/166(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i, C07C237/22(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. C07C235/20, C07C237/22

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	１９７１－２０１０年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１０年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１０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(STN), REGISTRY(STN), JSTPlus(JDreamII), JMEDPlus(JDreamII), JST7580(JDreamII)

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	SCHMIDT,D.M.Z. et al., trans-2-Phenylcyclopropylamine Is a Mechanism-Based Inactivator of the Histone Demethylase LSD1, Biochemistry, Vol.46, No.14, p.4408-4416 (2007).	1-5

☑ 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 ０５．０８．２０１０	国際調査報告の発送日 １７．０８．２０１０
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） ４Ｈ ４５１２ 小久保 敦規 電話番号 ０３－３５８１－１１０１ 内線 ３４４３

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（２００９年７月）

国際調査報告 国際出願番号 ＰＣＴ／ＪＰ２０１０／０５９４７６

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	TCHILIBON,S. et al., Exploring distal regions of the A_3 adenosine receptor binding site: sterically constrained N^6-(2-phenylethyl)adenosine derivatives as potent ligands, Bioorganic & Medicinal Chemistry, Vol.12, No.9, p.2021-2034 (2004).	1-5
P, X	UEDA,R. et al., Identification of Cell-Active Lysine Specific Demethylase 1-Selective Inhibitors, Journal of the American Chemical Society, Vol.131, No.48, p.17536-17537 (2009). Published on Web: 2009.11.16	1-5
P, A	BINDA,C. et al., Biochemical, Structural, and Biological Evaluation of Tranylcypromine Derivatives as Inhibitors of Histone Demethylases LSD1 and LSD2, Journal of the American Chemical Society, Vol.132, No.19, p.6827-6833 (2010). Published on Web: 2010.04.23	1-5

フロントページの続き

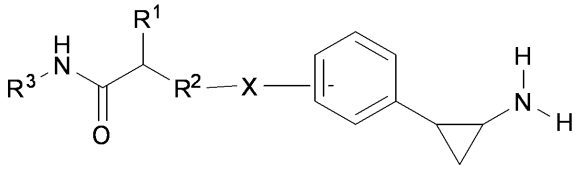
(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 35/00	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	35/00	
Ｃ１２Ｎ 9/99	*(2006.01)*	Ａ６１Ｐ	43/00 １２３	
		Ｃ１２Ｎ	9/99	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),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

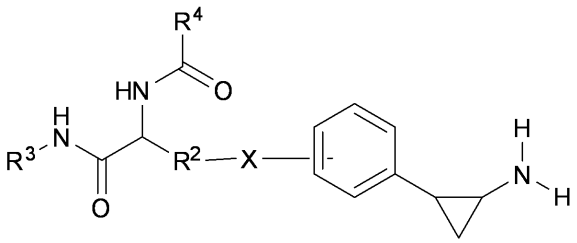
(72)発明者 鈴木 孝禎
愛知県名古屋市瑞穂区田辺通３－１ 公立大学法人名古屋市立大学内
(72)発明者 上田 理恵
愛知県名古屋市瑞穂区田辺通３－１ 公立大学法人名古屋市立大学内
(72)発明者 水上 民夫
滋賀県長浜市田村町１２６６番地 長浜バイオ大学内
(72)発明者 佐々木 隆造
滋賀県長浜市田村町１２８１番地８ 株式会社フロンティアファーマ内

Ｆターム(参考) 4C206 AA01 AA02 AA03 GA07 GA08 MA01 MA04 NA14 NA15 ZB26 ZC02
4H006 AA01 AA03 AB20 AB28 BJ20 BJ50 BP30 BU42 BV22

【要約の続き】



（Ｉ）



（Ⅱ）

【選択図】図１

（注）この公表は、国際事務局（ＷＩＰＯ）により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願（日本語実用新案登録出願）の国際公開の効果は、特許法第１８４条の１０第１項(実用新案法第４８条の１３第２項）により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。