

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7558187号

(P7558187)

(45)発行日 令和6年9月30日(2024.9.30)

(24)登録日 令和6年9月19日(2024.9.19)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 401/06 (2006.01)

C 0 7 D 401/06

C S P

A 6 1 K 31/4725(2006.01)

A 6 1 K 31/4725

A 6 1 P 7/06 (2006.01)

A 6 1 P 7/06

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00 1 1 1

請求項の数 25 (全80頁)

(21)出願番号 特願2021-553300(P2021-553300)

(86)(22)出願日 令和2年3月20日(2020.3.20)

(65)公表番号 特表2022-525293(P2022-525293
A)

(43)公表日 令和4年5月12日(2022.5.12)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/023989

(87)国際公開番号 WO2020/198054

(87)国際公開日 令和2年10月1日(2020.10.1)

審査請求日 令和5年3月17日(2023.3.17)

(31)優先権主張番号 62/823,214

(32)優先日 平成31年3月25日(2019.3.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 598174705

コールド スプリング ハーバー ラボラ
トリーアメリカ合衆国 1 1 7 2 4 ニューヨー
ク コールド スプリング ハーバー バン
グタウン ロード 1

(73)特許権者 305054418

ザ ファインスタイン インスティチュー
ツ フォー メディカル リサーチアメリカ合衆国 ニューヨーク 1 1 0 3
0 マンハセット、コミュニティー ドラ
イブ 3 5 0

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

最終頁に続く

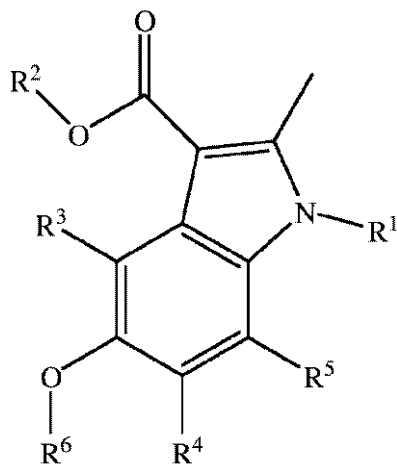
(54)【発明の名称】 貧血の処置におけるムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ4アンタゴニスト

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

式：

【化45】



の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーもしくは多形体

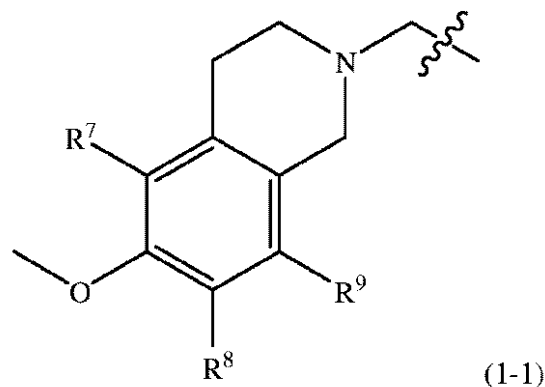
であって、式中、

R^1 が、 CH_3 であり、

R^2 が、炭素原子 1 ～ 3 個を有する炭化水素基であり、

R^3 、 R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH 、 SCH_3 および次の構造 (1-1) :

【化 4 6】



から独立的选择されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の 1 つまたは 2 つが、式 (1-1) の構造であり、

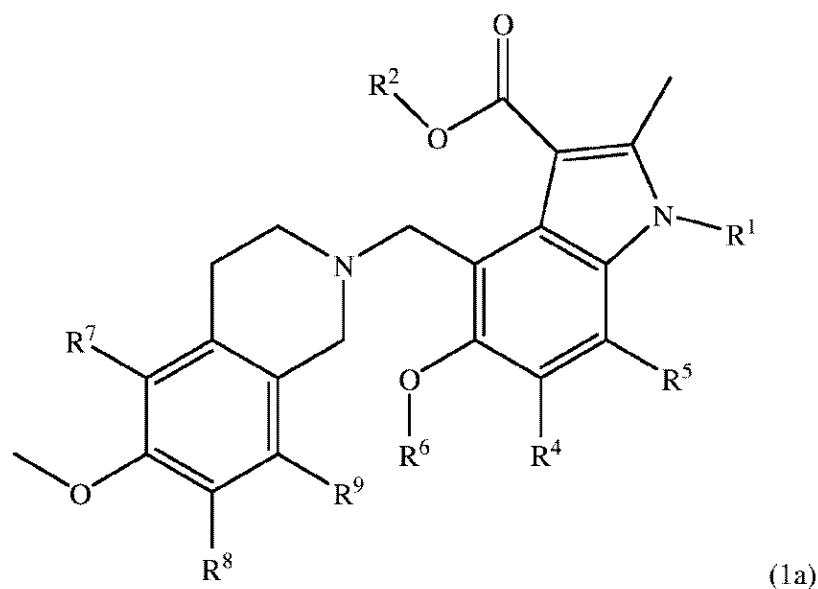
R^6 が、 H または CH_3 であり、

R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的选择される、化合物。

【請求項 2】

前記化合物が、次の式：

【化 4 7】



を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記化合物が、次の式：

10

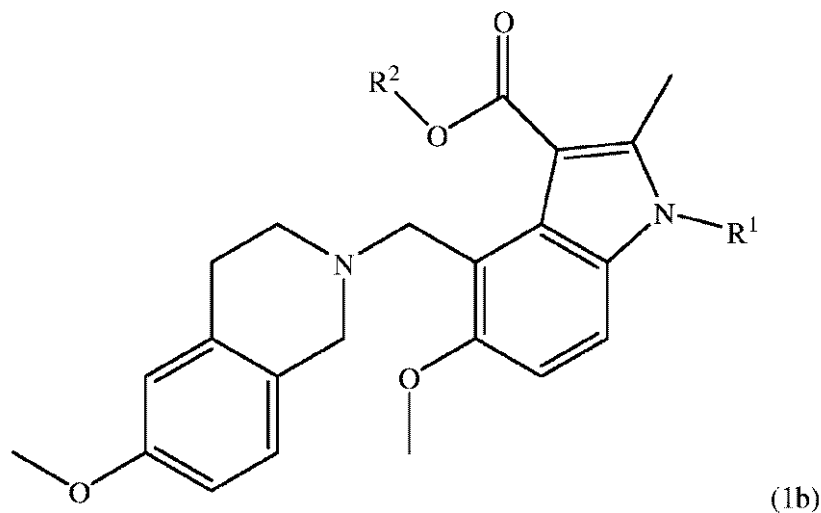
20

30

40

50

【化 4 8】



10

を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

R² がエチルである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

【請求項 5】

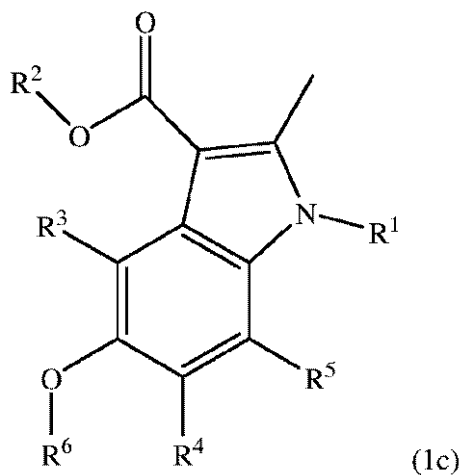
R¹ がメチルであり、そして R² がエチルである、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

20

【請求項 6】

式：

【化 4 9】



30

40

の化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーもしくは多形体であって、式中、

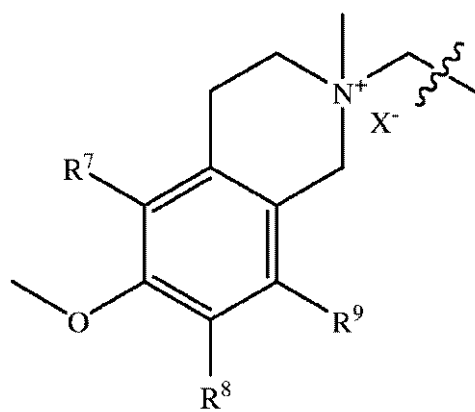
R¹ が、CH₃であり、

R² が、炭素原子 1 ～ 3 個を有する炭化水素基であり、

R³、R⁴ および R⁵ が、水素原子、ハロゲン原子、CH₃、CF₃、OH、OCH₃、SH、SCH₃ および次の構造 (1-2)：

50

【化 5 0】



10

から独立的に選択されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つが、式（1-2）の構造であり、

R^6 が、Hまたは CH_3 であり、

R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的に選択され、

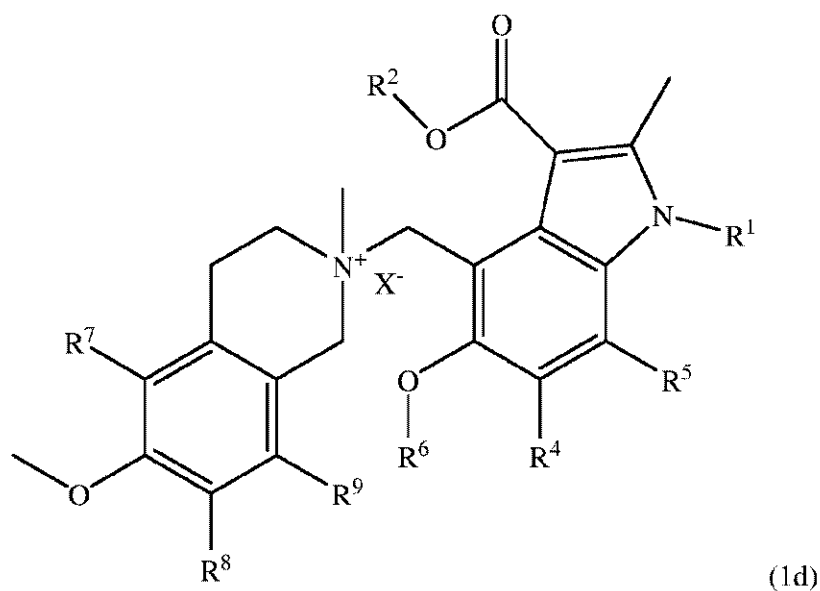
X^- が、前記化合物の正荷電部分を均衡させるアニオンである、化合物。

20

【請求項 7】

前記化合物が、次の式：

【化 5 1】



30

40

を有する、請求項 6 に記載の化合物。

【請求項 8】

前記化合物が、次の式：

50

10



20

R²がエチルである、請求項6から8のいずれか一項に記載の化合物。

R¹がメチルであり、そしてR²がエチルである、請求項6から8のいずれか一項に記載の化合物。

ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ4（M4）活性から生じる疾患または状態を被験体において処置するための、M4特異的アンタゴニストを含む組成物であって、前記M4特異的アンタゴニストが、次の式：

30

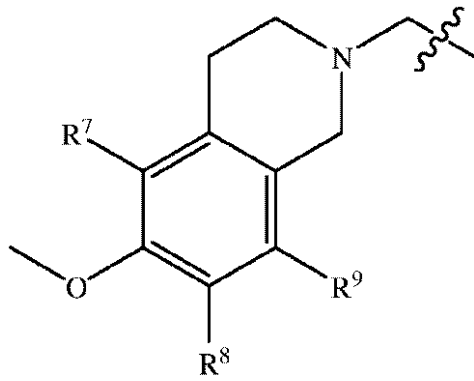


40

R¹が、CH₃であり、

R³、R⁴およびR⁵が、水素原子、ハロゲン原子、CH₃、CF₃、OH、OCH₃、SH、SCH₃および次の構造(1-1)：

【化 5 6】



10

から独立的に選択されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つが、式(1-1)の構造であり、

R^6 が、Hまたは CH_3 であり、

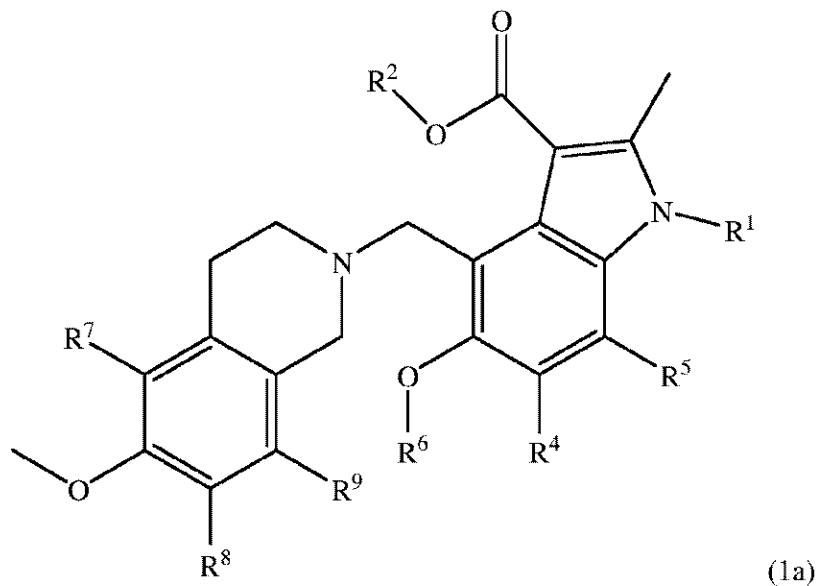
R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的に選択される、組成物。

【請求項 1 2】

前記化合物が、次の式：

20

【化 5 7】



30

を有する、請求項 1 1 に記載の組成物。

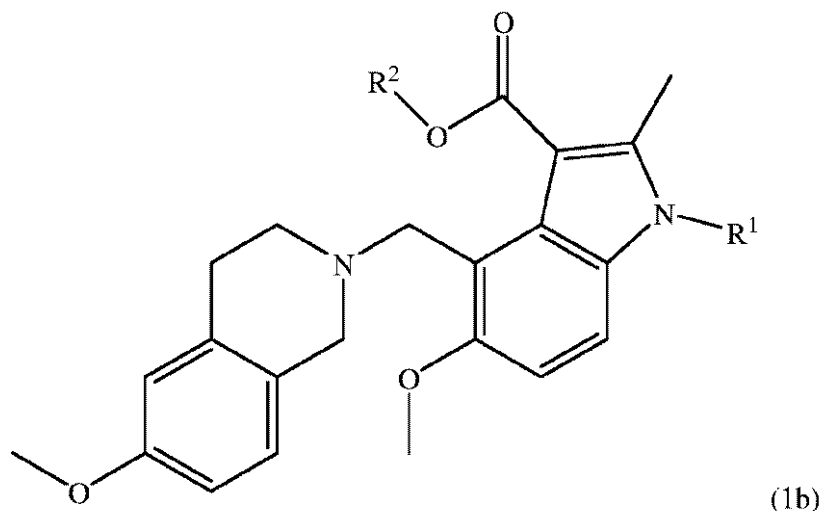
【請求項 1 3】

40

前記化合物が、次の式：

50

【化 5 8】



10

を有する、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 1 4】

R² がエチルである、請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 1 5】

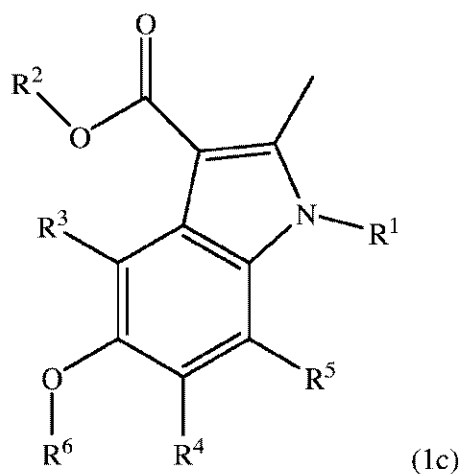
R¹ がメチルであり、そして R² がエチルである、請求項 1 1 から 1 3 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 1 6】

ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ 4 (M 4) 活性から生じる疾患または状態を被験体において処置するための、M 4 特異的アンタゴニストを含む組成物であって、前記 M 4 特異的アンタゴニストが、次の式：

【化 5 9】



30

40

を有する化合物、またはその薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーもしくは多形体であり、式中、

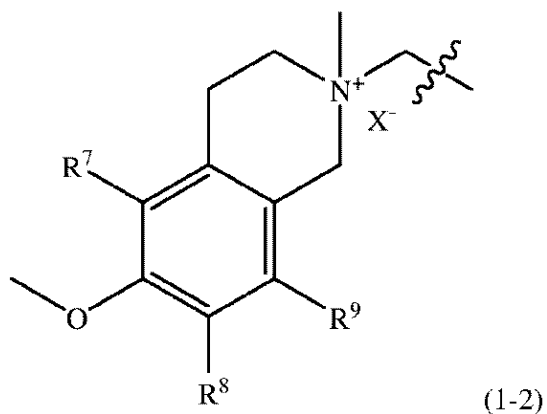
R¹ が、C H₃ であり、

R² が、炭素原子 1 ～ 3 個を有する炭化水素基であり、

R³、R⁴ および R⁵ が、水素原子、ハロゲン原子、C H₃、C F₃、O H、O C H₃、S H、S C H₃ および次の構造 (1 - 2)：

50

【化 6 0】



10

から独立的选择されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つが、式(1-2)の構造であり、

R^6 が、Hまたは CH_3 であり、

R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的选择され、

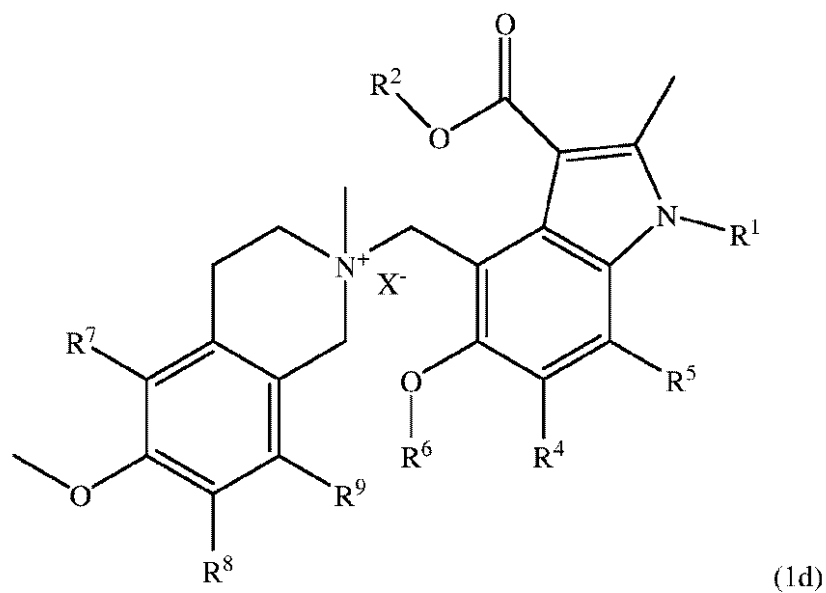
X^- が、前記化合物の正荷電部分を均衡させるアニオンである組成物。

【請求項 17】

20

前記化合物が、次の式：

【化 6 1】



30

を有する、請求項16に記載の組成物。

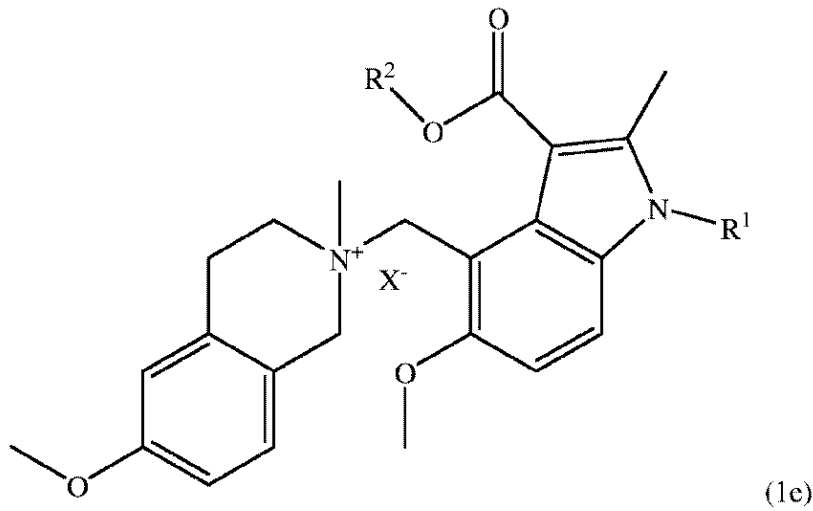
40

【請求項 18】

前記化合物が、次の式：

50

【化 6 2】



10

を有する、請求項 16 に記載の組成物。

【請求項 19】

R^2 がエチルである、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 20】

R^1 がメチルであり、そして R^2 がエチルである、請求項 16 から 18 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 21】

前記疾患または状態が、貧血である、請求項 11 から 20 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 22】

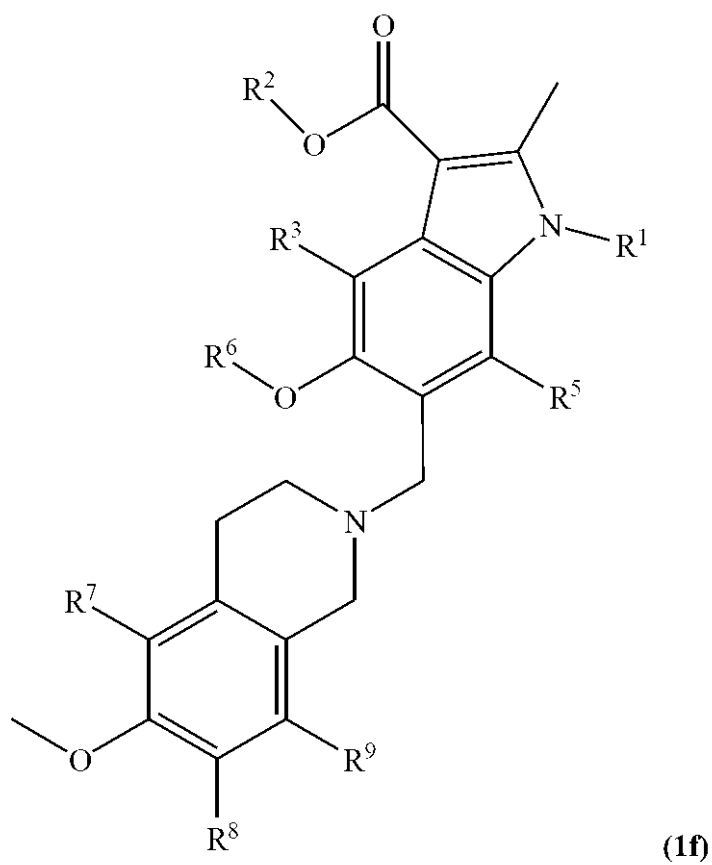
前記化合物が、次の式：

30

40

50

【化 7 1】

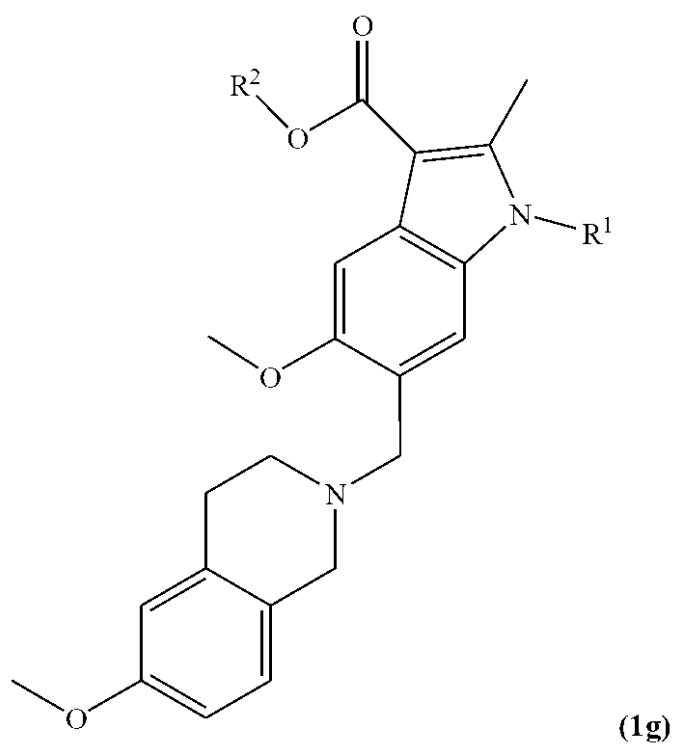


を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 2 3】

前記化合物が、次の式：

【化 7 2】

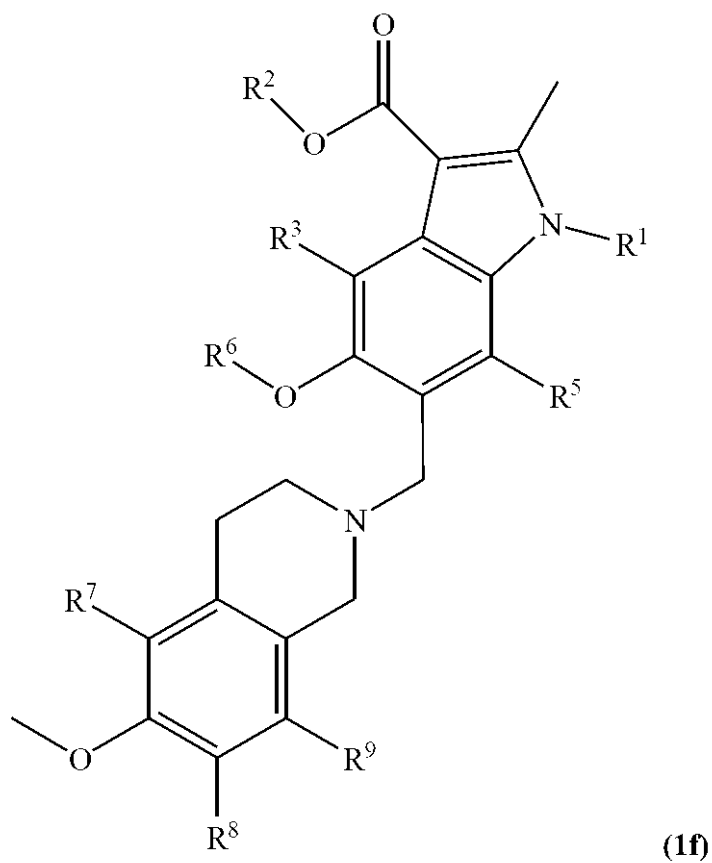


を有する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 2 4】

前記化合物が、次の式：

【化 7 3】

を有する、請求項 1 1 に記載の組成物。

【請求項 2 5】

前記化合物が、次の式：

10

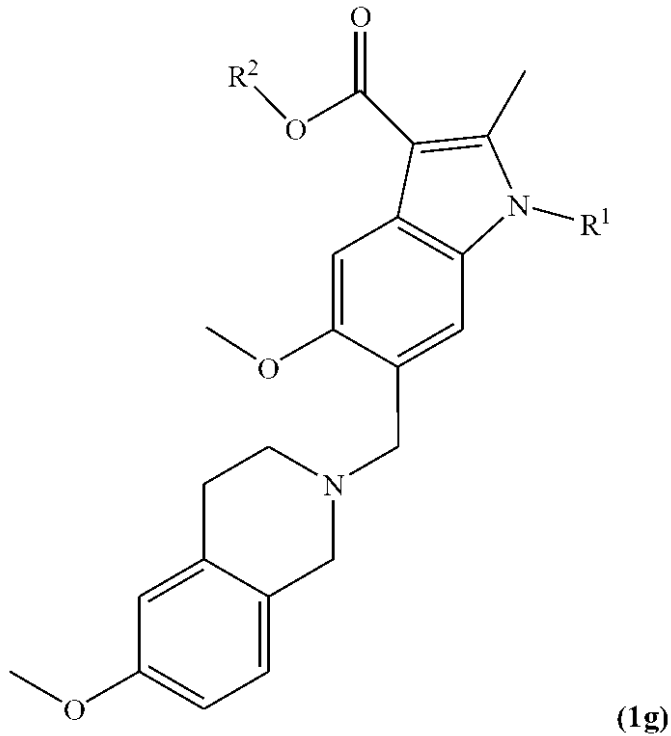
20

30

40

50

【化 7 4】



(1g)

を有する、請求項 1 1 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019年3月25日に出願された米国特許仮出願第62／823，214号の利益を主張し、この内容のすべてを参照により本明細書に組み込む。

【0002】

連邦支援による研究に関する記載

本発明は、アメリカ国立衛生研究所により付与されたHL127522の下、政府支援によりなされた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【0003】

本開示の分野

本開示は、ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ4（M4）活性から生じる疾患および状態の処置に一般に関する。より詳細には、本開示は、赤芽球バースト形成単位（BFUE）細胞の自己複製を促進して貧血を処置する、低分子M4アンタゴニスト化合物の使用に関する。

【背景技術】

【0004】

背景技術

多くの成体系列の幹細胞および前駆細胞は、組織恒常性、維持および再生の重大な側面である自己複製を経る（North T.E. et al., Nature 447:1007-1011 (2007); He S. et al., Annu Rev Cell Dev Biol 25:377-406 (2009); Simons B.D. et al., Cell 145:851-862 (2011); Seita J. et al., Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 2:640-653 (2010); Xu Y. et al., Nature 453:338-344 (2008); Sun J. et al., Nature 514:322-347 (2014); Sharpless N.E. et al., Nat Rev Mol Cell Biol 8:703-713 (2007); Rossi D.J. et al., Cell 132:681-696 (2008))。造血系では、赤芽球バースト形成単位（BFUE）は、第1の系列判定赤芽球前駆細胞であり、自己複製を経て数千の赤血球を生成する実質的可能性を有す

る。BFU-Eは、分化を経て、後期赤芽球前駆細胞であるコロニー形成単位赤芽球（CFU-E）の形成を生じ、このCFU-Eは、3～4個に限られた細胞分裂を経た後に赤血球を形成する（Zhang L. et al., Genes Dev 25:119-124 (2011)）。CFU-Eの生存および分化は、エリスロポエチン（EPO）により主に調節されており、BFU-Eの自己複製および分化の制御は、あまり解明されていない。EPOは、慢性腎臓疾患に見られるような、EPO産生の異常により生じる貧血の処置に主に使用される。しかし、多くの貧血患者は、EPO処置に対する応答に十分なBFU-E、および引き続いて十分なCFU-Eを有しない（Flygare J. et al., Blood 117:3435-3444 (2011); Zhang L. et al., Nature 499:92-96 (2013); Sankaran V.G. et al., Nat Med 21:221-230 (2015); Bauer et al., Genes Dev 13:2996-3002 (1999); Komrokji R.S. et al., Curr Hematol Malig Rep 6:145-153 (2011); Kotla V. et al., J Hematol Onco. 2:36 (2009)）。このようなEPO抵抗性貧血を処置するために、BFU-E自己複製の根底にある分子機構のより良い理解が必要とされている。これまでの報告では、化合物PD102807が、ムスカリン性アセチルコリン受容体ファミリーの他のメンバーよりもCHRM4を選択的に阻害することが示されている（C. H. Croy et al., Characterization of PCS1055, a novel muscarinic M4 receptor antagonist. Eur. J. Pharmacol 782, 70-76, 2016; T. M. Boehme et al., Synthesis and pharmacology of benzoxazines as highly selective antagonists at M(4) muscarinic receptors. J Med. Chem 45, 3094-3102, 2002）。

10

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【文献】North T.E. et al., Nature 447:1007-1011 (2007)

【文献】He S. et al., Annu Rev Cell Dev Biol 25:377-406 (2009)

【文献】Simons B.D. et al., Cell 145:851-862 (2011)

【文献】Seita J. et al., Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med 2:640-653 (2010)

【文献】Xu Y. et al., Nature 453:338-344 (2008)

【文献】Sun J. et al., Nature 514:322-347 (2014)

【文献】Sharpless N.E. et al., Nat Rev Mol Cell Biol 8:703-713 (2007)

30

【文献】Rossi D.J. et al., Cell 132:681-696 (2008)

【文献】Zhang L. et al., Genes Dev 25:119-124 (2011)

【文献】Flygare J. et al., Blood 117:3435-3444 (2011)

【文献】Zhang L. et al., Nature 499:92-96 (2013)

【文献】Sankaran V.G. et al., Nat Med 21:221-230 (2015)

【文献】Bauer et al., Genes Dev 13:2996-3002 (1999)

【文献】Komrokji R.S. et al., Curr Hematol Malig Rep 6:145-153 (2011)

【文献】Kotla V. et al., J Hematol Onco. 2:36 (2009)

【文献】C. H. Croy et al., Characterization of PCS1055, a novel muscarinic M4 receptor antagonist. Eur. J. Pharmacol 782, 70-76, 2016

40

【文献】T. M. Boehme et al., Synthesis and pharmacology of benzoxazines as highly selective antagonists at M(4) muscarinic receptors. J Med. Chem 45, 3094-3102, 2002

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

本開示の概要

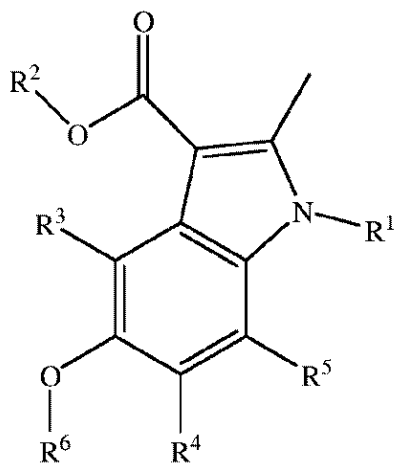
一態様では、本開示は、ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ4（M4）アンタゴニストとして機能する化合物を対象とする。M4アンタゴニスト化合物は、他のムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ（例えば、M1、M2、M3および／またはM

50

5)と比較してM4に対して、少なくともある程度、好ましくは、選択的（すなわち、特異的）である。M4特異的アンタゴニストの有効性は、M4のオルソステリックポケットに結合する能力のおかげで生じると考えられている。また、M4アンタゴニスト化合物では、当技術分野の他のM4アンタゴニスト化合物、例えば、PD102807と比較して、血液脳関門への浸透が、好ましくは、低下する。

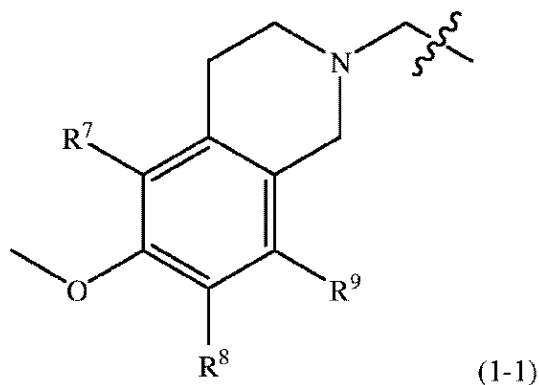
実施形態の第1のセットでは、M4アンタゴニスト化合物は、次の構造：

【化1】



を有し、式中、 R^1 は、Hまたは CH_3 であり、 R^2 は、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、 R^3 、 R^4 および R^5 は、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SH、 SCH_3 および次の構造（1-1）：

【化2】



から独立的に選択されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つは、式（1-1）の構造であり、 R^6 は、Hまたは CH_3 であり、 R^7 、 R^8 および R^9 は、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的に選択され、式（1）の化合物は、式（1）の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む。

【0007】

特定の実施形態では、式（1）の化合物は、次の構造：

10

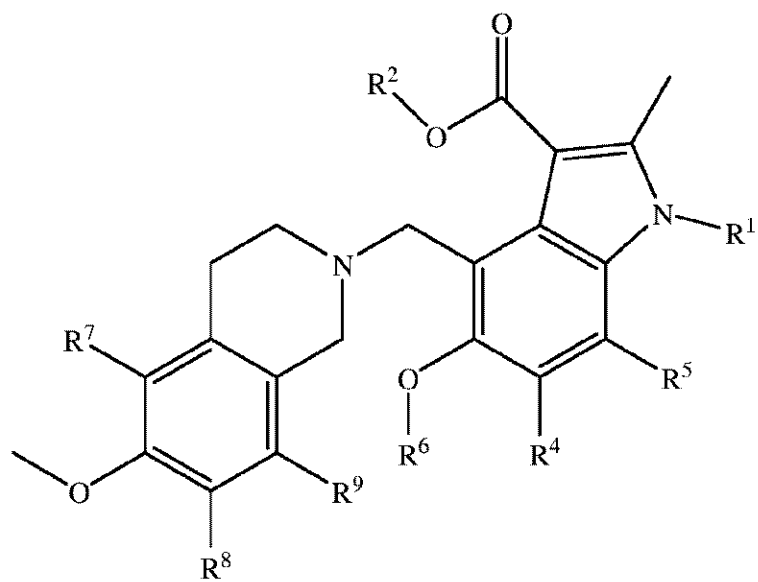
20

30

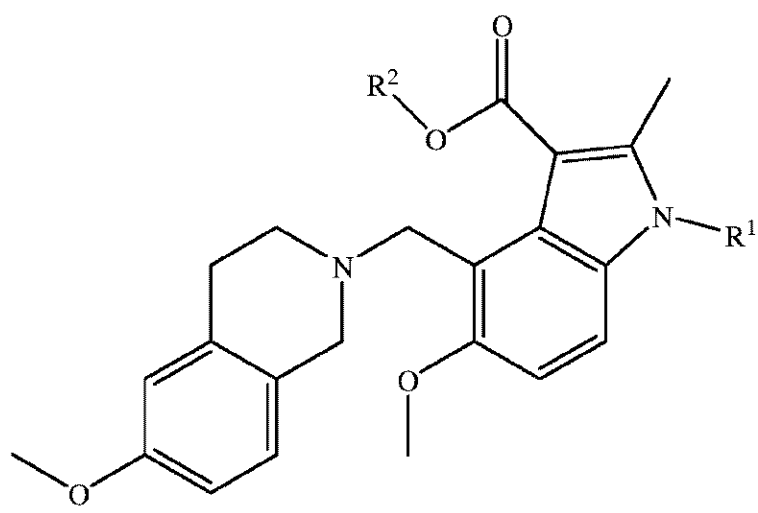
40

50

【化 3】



(1a), または



(1b)

を有し、式中、上に示す式における R 基は、上または下に定義するものであり、提供する特定の選択のいずれかを含む。

【 0 0 0 8 】

また、式 (1) の化合物は、次の構造：

10

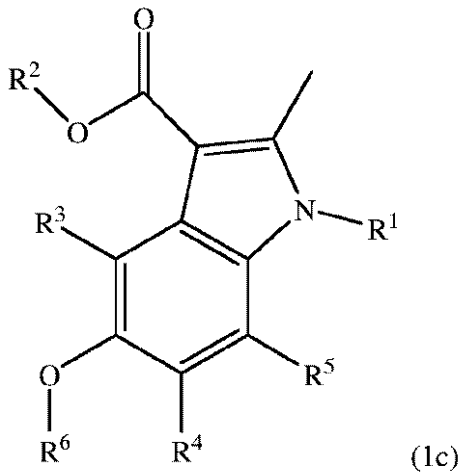
20

30

40

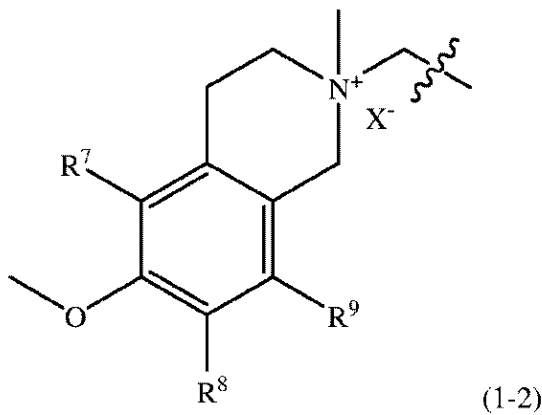
50

【化 4】



を有するメチル化塩であってもよく、式中、 R^1 は、Hまたは CH_3 であり、 R^2 は、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、 R^3 、 R^4 および R^5 は、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SH、 SCH_3 および次の構造（1-2）：

【化 5】



から独立的选择されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つは、式（1-2）の構造であり、 R^6 は、Hまたは CH_3 であり、 R^7 、 R^8 および R^9 は、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的选择され、 X^- は、化合物の正荷電部分を均衡させるアニオンであり、式（1c）の化合物は、式（1c）の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む。

【0009】

特定の実施形態では、式（1c）のメチル化塩化合物は、次の構造：

10

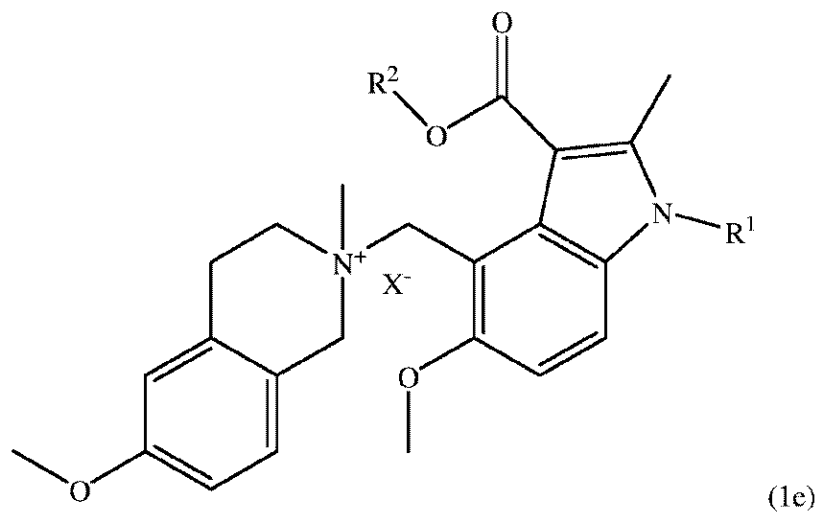
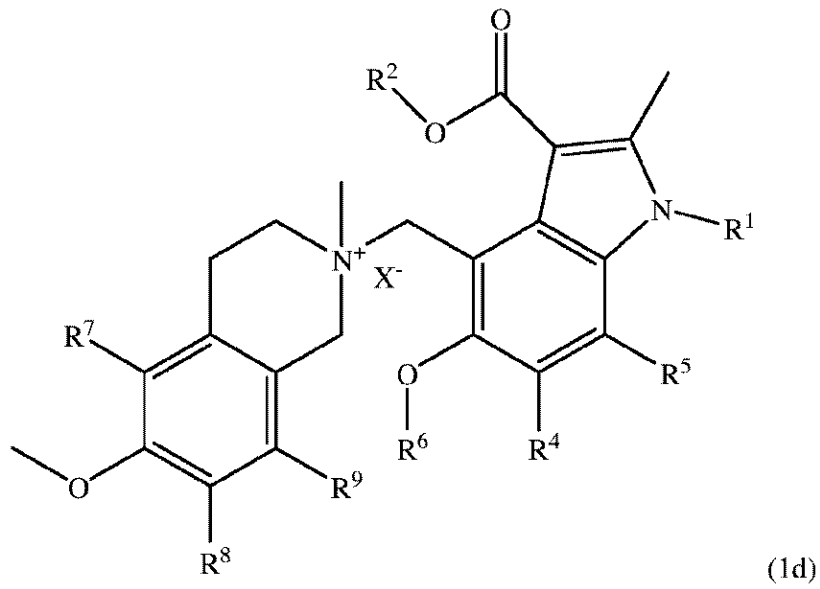
20

30

40

50

【化 6】



のいずれかを有し、式中、上に示す式における R 基および X^- は、上または下に定義するものであり、提供する特定の選択のいずれかを含む。

【 0 0 1 0 】

実施形態の第 2 のセットでは、M 4 アンタゴニスト化合物は、次の構造：

10

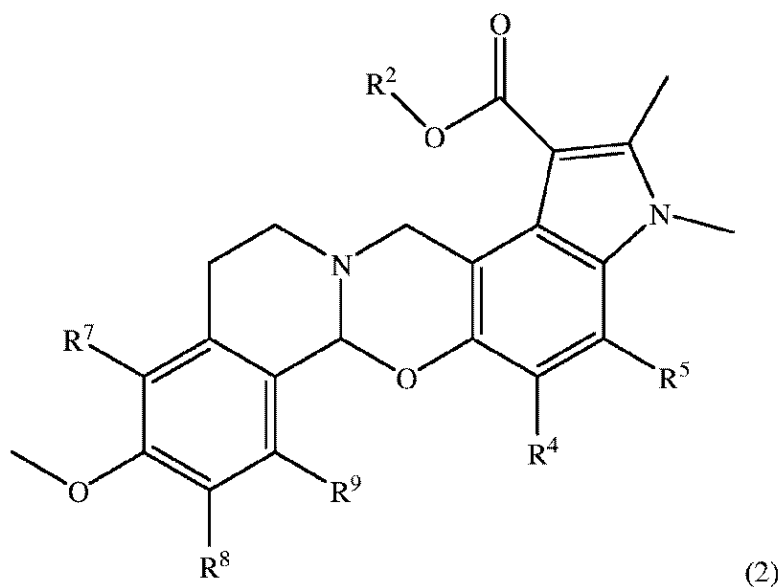
20

30

40

50

【化 7】

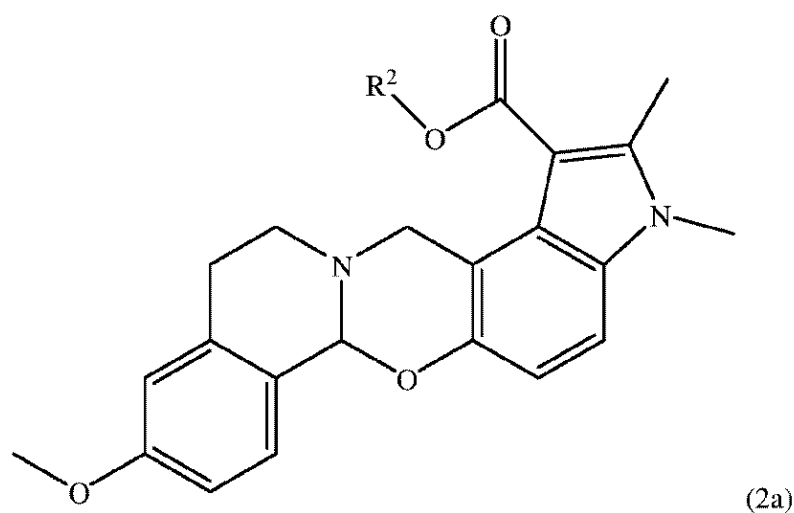


を有し、式中、R²は、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、R⁴、R⁵、R⁷、R⁸およびR⁹は、水素原子、ハロゲン原子、CH₃、CF₃、OH、OCH₃、SHおよびSCH₃から独立的に選択され、式(2)の化合物は、式(2)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む。

【0011】

特定の実施形態では、式(2)の化合物は、次の構造：

【化 8】



を有し、式中、R²は、上または下に定義するものであり、提供する特定の選択のいずれかを含む。

【0012】

実施形態の第3のセットでは、M4アンタゴニスト化合物は、次の構造：

10

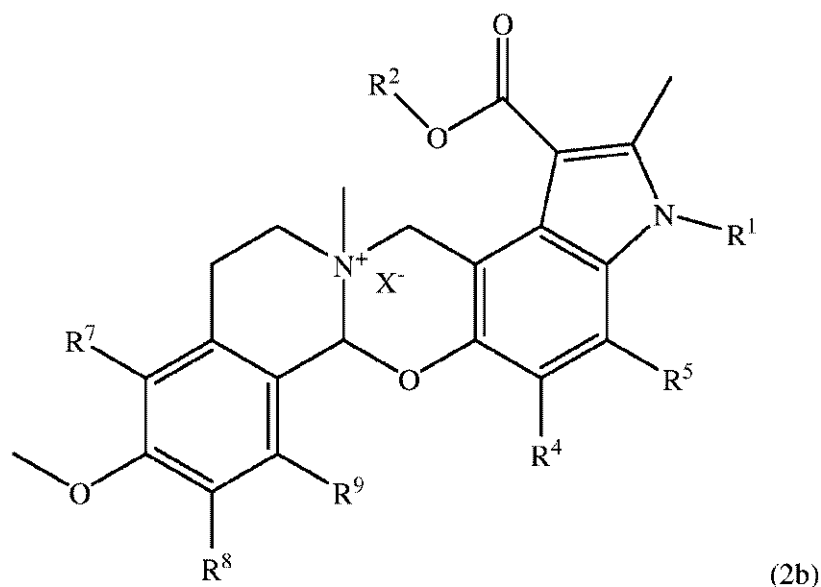
20

30

40

50

【化 9】



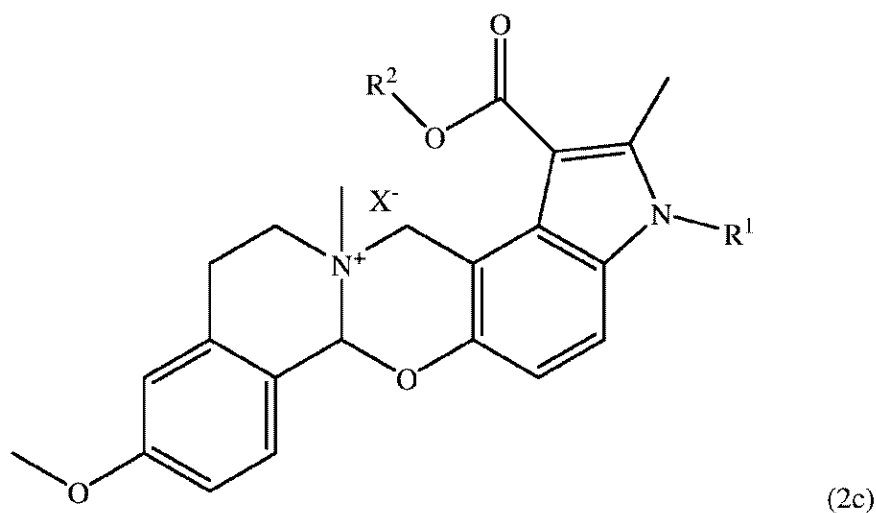
を有し、式中、 R^1 は、Hまたは CH_3 であり、 R^2 は、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、 R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^8 および R^9 は、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的选择され、式(2b)の化合物は、式(2b)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む。

20

【0013】

特定の実施形態では、式(2b)の化合物は、次の構造：

【化10】



を有し、式中、 R^1 、 R^2 および X^- は、上または下に定義するものであり、提供する特定の選択のいずれかを含む。

40

【0014】

別の態様では、本開示は、ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ4(M4)活性から生じる疾患または状態の被験体における処置することであって、方法は、薬学的有効量のM4特異的アンタゴニストを被験体に投与するステップを含み、このM4特異的アンタゴニストが、上記のM4特異的アンタゴニスト化合物のいずれか1つである、ことを対象とする。特定の実施形態では、処置する疾患または状態は、貧血である。一部の実施形態では、貧血は、溶血、骨髓異形成症候群(MDS)、老化、外科手術、化学療法また

50

は放射線療法と関連する。一部の実施形態では、M4 アンタゴニストは、被験体に経口的に投与される。本開示の他の態様は、上記のM4 特異的アンタゴニストのいずれかの1つまたは1つより多くを含む医薬組成物、ならびにM4 活性から生じる疾患または状態、例えば、貧血を被験体において処置するための医薬の調製における、このようなM4 特異的アンタゴニストのいずれか1つまたは1つより多くの使用を対象とする。

【0015】

別の態様では、本開示は、赤芽球バースト形成単位（BFUE）細胞の自己複製を促進するための方法であって、方法が、BFUE細胞をM4 特異的アンタゴニストと接触させるステップを含む、方法を対象とする。BFUE細胞は、例えば、M4 特異的アンタゴニストと接触させるときに、生体（例えば、ヒト）被験体内に存在し得るか、またはBFUE細胞は、被験体から採取されて、M4 特異的アンタゴニストと *ex vivo* で接触させられ得る。M4 特異的アンタゴニストは、本明細書に記載するM4 特異的アンタゴニストのいずれかを含み得る。特定の実施形態では、BFUE細胞の自己複製の増加を利用して、被験体における貧血を処置する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1A～1E。ムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストにより、BFUE自己複製の制御によって赤血球の産生が増加する。1A、臭化オキシフェノニウム（OB）の化学構造を示す模式図。1B、100 μ Mの臭化オキシフェノニウムの有無によりマウスBFUEを培養し、培養系における細胞数を計数した；非処理よりもOBで処理した培養物において細胞増殖倍率が有意に高かった。3回の反復の平均および標準偏差（STDEV）を示す。1C、14日目の培養細胞を抗Ter119抗体で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。3回の反復のTer119+細胞のパーセンテージの平均およびSTDEVを示す；OBで処理または非処理の培養物におけるTer119+細胞のパーセンテージの差は存在しなかった。1D、6日目の培養細胞をメチルセルロース培地上に播種した。播種から9日後にBFUEコロニーを計数した。3回の反復の平均およびSTDEVを示す；非処理よりもOBで処理した培養物から有意により多くのBFUEコロニーが生じた。1E、ヒトCD34+細胞を、臭化オキシフェノニウム（200 μ M）の有無により培養し、培養系における細胞数を計数した。3回の反復の平均およびSTDEVを示す；非処理よりもOBにより処理した培養物において増殖倍率が有意に高かった。「NS」は統計学的有意差なしを表し、「*」はt検定による $p < 0.05$ を表し、「**」はt検定による $p < 0.01$ を表す。

【0017】

【図2】図2A～2D。CHRM4によりBFUE自己複製が負に制御される。図2A：Chrm1、Chrm2、Chrm3、Chrm4およびChrm5を含むムスカリン性アセチルコリン受容体ファミリーメンバーの、BFUE、CFUEおよび赤芽球の段階における発現レベルをRNA-Seqを使用して測定した。RPKM値を示す。図2B：対照ウイルスまたはChrm4を標的とするshRNAをコードするウイルスのいずれかをBFUEに感染させた。0日目～9日目に培養系におけるGFP+細胞数を計数した。3回の反復の平均および標準偏差（STDEV）を示す；GFP+対照ウイルスshRNA感染細胞よりもGFP+Chrm4ウイルスshRNA感染細胞において細胞増殖倍率が有意に高かった。図2C：培養から3日目に、対照ウイルスまたはChrm4を標的とするshRNAをコードするウイルスのいずれかを感染させたBFUEにおけるChrm4の発現レベルを、ウエスタンブロットを使用して測定した。3回の反復の平均および標準偏差（STDEV）を示す；Chrm4の発現は、Chrm4を標的とするshRNAによる処理後に有意に減少する。図2D：対照ウイルスまたはChrm4を標的とするshRNAをコードするウイルスのいずれかをBFUEに感染させた。GFP+細胞を分類してBFUEコロニー形成アッセイを行った。4回の反復の平均およびSTDEVを示す；GFP+対照ウイルスshRNA感染細胞よりもGFP+Chrm4ウイルスshRNA感染細胞においてBFUEコロニー形成倍率が有意に高かった。「*」

は t 検定による $p < 0.05$ を表し、「**」は $p < 0.01$ を表し、「***」は t 検定による $p < 0.001$ を表す。

【0018】

【図3】図3A～3D。CHRM4経路により、BFUEの前駆状態の維持に重要な遺伝子が制御されることを示す図である。図3A：100 μ Mのフォルスコリンの非存在または存在下でマウスBFUEを培養した。10日目に、培養系における細胞の全数を計数した。3回の反復の細胞増殖倍率の平均およびSTDEVを示す；非処理よりもcAMP活性化物質であるフォルスコリンで処理した培養物において細胞増殖倍率が有意に高かった。図3B：マウスBFUEを指示化合物（3 nMのPD102807および5 μ MのKT5720）とともに培養した。9日目に、培養系における細胞の全数を計数した。3回の反復の細胞増殖倍率の平均およびSTDEVを示す；非処理よりもPKA阻害物質であるKT5720で処理した培養物において細胞増殖倍率が有意に低下した。図3C：x軸は、 $\log_2$ 比として算出した、CFUEのBFUEに対する各遺伝子発現の比率を表す。y軸は、累積率を表し、相対発現（x軸）の関数としてプロットする。「CREB標的」は、ChIP-Seqにより同定されたBFUEにおけるCREBの直接標的遺伝子を表す。「ZFP36L2標的」は、これまでに報告されているように（Zhang L. et al., Nature 499:92-96 (2013)) RIP-ChIPにより同定されたBFUEにおけるZFP36L2の直接標的遺伝子を表す。「すべての遺伝子」は、これまでに報告されているように（Zhang L. et al., 上記参照）BFUEにおいて発現する遺伝子のすべてを表す。P値は、コルモゴロフ・スミルノフ検定を使用して算出した。図3D：100 μ Mの臭化オキシフェノニウムの非存在または存在下でマウスBFUEを培養し、培養3日目の細胞に対してRNA-Seqを実施した。100 μ Mの臭化オキシフェノニウムによる45分間の培養後にBFUEに対してCREB ChIP-Seqを実施した。RNA-Seq結果およびCREB ChIP-Seq結果を複合させてBETA解析を行った（Wang S. et al., Nat Protoc 8:2502-2515 (2013))。「*」は $p < 0.05$ を表し、「**」は t 検定による $p < 0.01$ を表す。

【0019】

【図4】図4A～4E。化合物PD102807によりBFUE自己複製が促進され、*in vivo*において貧血が矯正される。図4A：PD102807の化学構造。図4B：3 nMのPD102807の有無によりマウスBFUEを培養し、培養系における細胞数を計数した。9回の反復の平均および標準偏差（STDEV）を示す；非処理よりもOBで処理した培養物においてBFUEの増殖倍率が有意に高かった。「***」は $p < 0.001$ を表す。図4C：DMSOまたは100 mg/kgのPD102807を経口送達により1日1回マウスに処置した。マウスにPHZを注射して、溶血性貧血を誘導した。6日目にCBCを実施した。HCTの平均およびSTDEVを示す；PHZにより誘導された貧血は、DMSO対照よりもPD102807を処置したマウスにおいて有意に改善した。図4D：RBCの平均およびSTDEVを示す；PHZにより誘導された貧血が、DMSO対照よりもPD102807を処置したマウスにおいて有意に改善した。「**」は $p < 0.01$ を表す。図4E： 1×10^{-9} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-6} Mおよび 1×10^{-5} Mの濃度のPD102807を、放射性リガンドおよび受容体を有する細胞膜を用いた標準的結合アッセイにおいて試験した。化合物の結合は、各標的に特異的な放射活性標識リガンドの結合の阻害パーセントとして算出し、 K_i 値を決定した。PD102807は、M4受容体の指示する選択性／特異性をM1、M2、M3またはM5受容体に対して有する。

【0020】

【図5】図5。化合物A～Kと名付けた一連のM4アンタゴニスト化合物の構造。

【0021】

【図6】図6。受容体CHRM1～5（M1～M5）に対するPD102807および化合物A～Kについての受容体結合アッセイの結果を示す。

【0022】

10

20

30

40

50

【図 7】図 7 および図 8。初代マウス B F U - E 培養アッセイの結果。図 7 は、化合物 A、B、C、H および I についての結果を示し、図 8 は、化合物 D、E、F、G、J および K についての結果を示す。マウス初代細胞 B F U - E 培養アッセイの結果は、化合物 A ~ K が、B F U - E 増殖の刺激において P D とほぼ同等に強力であることを示す；すべての化合物が、低ナノモル濃度範囲において有効であり、化合物 B および F において、有効性が他よりもわずかに劣った。

【図 8】図 7 および図 8。初代マウス B F U - E 培養アッセイの結果。図 7 は、化合物 A、B、C、H および I についての結果を示し、一方で図 8 は、化合物 D、E、F、G、J および K についての結果を示す。マウス初代細胞 B F U - E 培養アッセイの結果は、化合物 A ~ K が、B F U - E 増殖の刺激において P D とほぼ同等に強力であることを示す；すべての化合物が、低ナノモル濃度範囲において有効であり、化合物 B および F において、有効性が他よりもわずかに劣った。

10

【0023】

【図 9】図 9。P D 1 0 2 8 0 7 ならびに化合物 A および B の薬物動態プロファイル（血漿）および脳浸透アッセイ。濃度は、上パネルに示し、濃度比（血漿／脳）は、下パネルに示す。

【0024】

【図 10】図 10。化合物 A（上パネル）および化合物 B（下パネル）についての i n v i v o での貧血動物モデル有効性アッセイにおける化合物の結果。

【0025】

20

【図 11】図 11。を化合物 B（上パネル）および化合物 I（下パネル）についての i n v i v o での貧血動物モデル有効性アッセイにおける化合物の結果。

【0026】

【図 12】図 12。化合物 G の薬物動態プロファイル（血漿）および脳浸透アッセイ。濃度のプロットは、上パネルに示し、濃度比（血漿／脳）のプロットは、下パネルに示す。

【発明を実施するための形態】

【0027】

詳細な説明

ムスカリン性アセチルコリン受容体 C H R M 4 経路が B F U - E 自己複製の重要な制御因子であることが、本発明に従って本明細書において見出された。ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ 4 アンタゴニストにより、B F U - E の自己複製および増殖が促進され、溶血、M D S および老化マウスモデルにおいて貧血が改善されることが本明細書において実証された。したがって、貧血の処置のための治療法における M 4 特異的アンタゴニストの使用を本明細書において提供する。

30

【0028】

ムスカリン性アセチルコリン受容体

【0029】

ムスカリン性アセチルコリン受容体は、G タンパク質共役受容体ファミリーのメンバーであり、すなわち、このような受容体は、リガンド（アセチルコリン）の結合時に細胞膜において G タンパク質受容体複合体を形成し、これにより下流のシグナル伝達を引き起こされる。ムスカリン性受容体の 5 つのサブタイプが同定されており、M 1 ~ M 5 と名付けられている（例えば、Felder et al., FASEB J.: Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 9, 619-625 (1995)を参照）。M 1、M 3 および M 5 受容体は G q / G 1 1 型 G タンパク質に主に共役し、G タンパク質受容体複合体のこの形成によりジアシルグリセロールの形成が生じ、これによりプロテインキナーゼ C が活性化されてイノシトール三リン酸（I P 3）の放出が増加し、遊離の細胞内 C a 2 + の放出が生じる。M 2 および M 4 受容体は G i / G o 型 G タンパク質に主に共役し、c A M P 産生において阻害的役割を果たす（Felder et al. (1995)、上記参照）。

40

【0030】

ムスカリン性アセチルコリン受容体は、細胞内および細胞外ループが交互に入れ替わる

50

ことにより結合する7つの膜貫通ドメインを含む。M1～M5受容体サブタイプは、高度な配列同一性を相互間で呈するが、研究では、オルソステリックポケットの形状における構造的差異 (Bonner et al., Science 237: 527-532 (1987); Caulfield et al., Pharmacol. Rev. 50: 279-290 (1998); および Hulme et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 30: 633-673 (1990)) ならびにアゴニストまたはアンタゴニストの結合における薬理学的差異 (Bohme et al., J. Med. Chem. 45: 3094-3102 (2002); および Croy et al., Europ. J. Pharmacol 782: 70-76 (2016)) が明らかとなっている。このような構造的および薬理学的差異と一致して、サブタイプ特異的アンタゴニストが開発および立証されている。

【0031】

M4特異的アンタゴニスト

【0032】

ムスカリン性アセチルコリン受容体の「アンタゴニスト」という用語は、本明細書において使用する場合、ムスカリン性アセチルコリン受容体に結合し得るが、下流のシグナル伝達 (例えば、Gタンパク質の共役および／または活性化) を引き起こさない化合物を指す。したがって、ムスカリン性アセチルコリン受容体のアンタゴニストは、受容体への結合において天然リガンドであるアセチルコリンと競合することにより、受容体へのアセチルコリンの結合に対して干渉、遮断またはさもなければ予防して、ムスカリン性アセチルコリン受容体の生物学的活性を阻害する。一部の実施形態では、ムスカリン性アセチルコリン受容体の生物学的活性の阻害は、Gタンパク質活性化の阻害に反映される。Gタンパク質活性化は、例えば、Croy et al., Eur. J. Pharmacol. 782: 70-76 (2016) により記載されるように、G α サブユニットに結合する非加水分解性GTP- γ -[³⁵S]の量によって測定することができる。

【0033】

「M4特異的」アンタゴニストという用語は、他のムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ、すなわち、M1～M3およびM5よりも、M4への結合に対する優先性を呈するアンタゴニストを指す。一部の実施形態では、M4への結合における優先性は、他の受容体サブタイプよりも高い、M4への親和性に反映される。特定の実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、他の受容体サブタイプ (例えば、M1、M2、M3および／またはM5) の1つまたは1つより多くへの親和性よりも少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または100%高い、M4への親和性を有し、この場合、「100%高い」は、比較する親和性よりも1倍より高いか、またはこの2倍であることに等しい。一部の実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、他の受容体サブタイプの1つまたは1つより多くへの親和性よりも少なくとも2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90もしくは100倍またはこれより高いM4への親和性を有する。

【0034】

「選択性」という用語は、本明細書において使用する場合、一方の受容体サブタイプに対する、他方の受容体サブタイプよりも高いアンタゴニストの親和性を指す。選択性は、比較する受容体の結合親和性の比率に基づいて判定することができる。例えば、M4およびM2の間のアンタゴニストの選択性は、M4への結合親和性の、M2への結合親和性に対する比率により測定する。別の例として、M4およびM3の間のアンタゴニストの選択性は、M4への結合親和性の、M3への結合親和性に対する比率により測定する。また、K_iが結合親和性と逆相関するため、選択性は、M2またはM3のK_iの、M4のK_iに対する比率に基づいて判定することができ、この場合、比率が1を超えると、M2またはM3よりも、M4に対して優先性を有することを意味する。特定の実施形態では、M4特異的アンタゴニストの選択性は、他の受容体サブタイプの1つまたは1つより多くに対して少なくとも10、20、30、40、50、60、70、80、90、100倍である。

【0035】

ムスカリン性アセチルコリン受容体に対する化合物の結合親和性を測定するための方法

は、例えば、トランスフェクト CHO 細胞由来の膜を使用する $[^3\text{H}]$ NMS 結合により当技術分野において考証されている。Bohme et al. (J. Med. Chem 2002, 45: 3094-3192)、Dorje et al. (J. Pharmacol. Exp. Ther. 1991, 256: 727-733) および Buckley et al. (Mol. Pharmacol. 1989, 35: 469-476) を参照されたい。試験化合物の K_i 値 (すなわち、平衡解離定数) は、Cheng-Prusoff の式、 $K_i = \text{IC}_{50} / (1 + L / K_d)$ を使用して IC_{50} 値から得る。 K_i 値が低いほど親和性は高くなる。対照的に、 pK_i は K_i の負の対数であるため、 pK_i 値が高いほど親和性は高くなる。

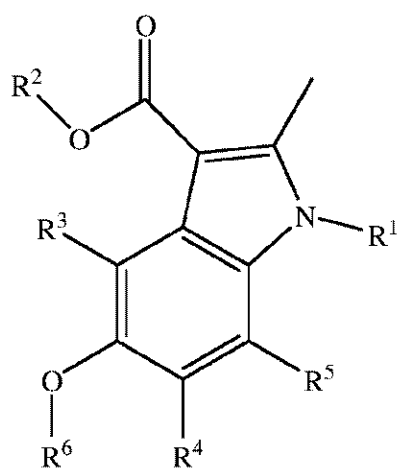
【0036】

一部の実施形態では、M4 特異的アンタゴニストは、M4 への結合について 6.0、6.25、6.5、6.75、7.0、7.25、7.5、7.75、8.0、8.25、8.5、8.75、9.0 またはこれより高い pK_i 値を有する。一部の実施形態では、M4 特異的アンタゴニストは、M4 について、6.0、6.25、6.5、6.75、7.0、7.25、7.5、7.75、8.0、8.25、8.5、8.75、9.0 またはこれより高い pK_i 値、および少なくとも 30、40、50、60、70、80、90、100 倍の選択性を、他の受容体サブタイプの 1 つまたは 1 つより多くに対して有する。

【0037】

実施形態の 1 セットでは、M4 アンタゴニスト化合物は、次の構造：

【化 11】



を有する。

【0038】

上記の式 (1) では、変数 R^1 および R^6 は、水素原子 (H) およびメチル (CH_3) から独立的に選択され (すなわち、それぞれは、H または CH_3 のいずれか)、変数 R^2 は、炭素原子 1 ~ 3 個を有する炭化水素基であり (例えば、メチル、エチル、 n -プロピル、イソプロピル、シクロプロピル、ビニルまたはプロペン-2-イル)、変数 R^3 、 R^4 および R^5 は、水素原子、ハロゲン原子 (すなわち、F、Cl、Br または I)、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SH、 SCH_3 および次の構造 (1-1)：

10

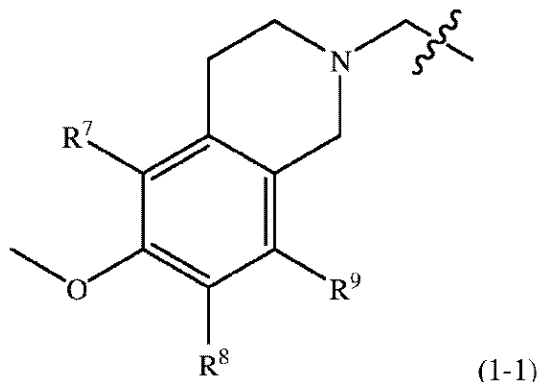
20

30

40

50

【化 1 2】



から独立的に選択されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つは、式(1-1)の構造である。一部の実施形態では、 R^3 、 R^4 および R^5 のうちの1つは、式(1-1)の構造である。他の実施形態では、 R^3 、 R^4 および R^5 のうちの2つ(例えば、 R^3 および R^4 、または R^3 および R^5 、または R^4 および R^5)は、式(1-1)の構造である。式(1-1)における変数 R^7 、 R^8 および R^9 は、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択される。 R^3 、 R^4 および R^5 のうちの2つが式(1-1)の構造である場合、式(1-1)における R^7 、 R^8 および R^9 は、式(1-1)の2つの場合の間で同一であるか、または異なり得る(すなわち、独立的に選択される)。また、式(1)は、式(1)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む。

【0039】

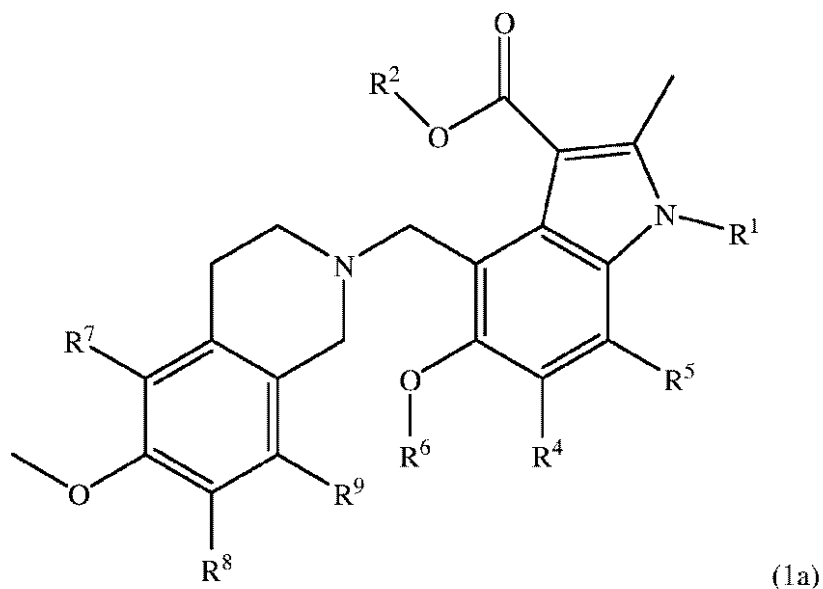
式(1)の実施形態の第1のセットでは、 R^1 がHであり、 R^2 が、メチル、エチル、 n -プロピルもしくはイソプロピルであるか、または R^1 がHであり、 R^2 が、メチルもしくはエチルであるか、または R^1 がHであり、 R^2 がエチルである。式(1)の実施形態の第2のセットでは、 R^1 がメチルであり、 R^2 が、メチル、エチル、 n -プロピルもしくはイソプロピルであるか、または R^1 がメチルであり、 R^2 が、メチルもしくはエチルであるか、または R^1 がメチルであり、 R^2 がエチルである。式(1)の実施形態の第3のセットでは、少なくとも R^3 もしくは R^3 のみが、式(1-1)であり、 R^4 および/もしくは R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^3 が式(1-1)であり、 R^4 および/もしくは R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^3 が式(1-1)であり、 R^4 および R^5 の1つもしくは両方が、水素原子である。式(1)の実施形態の第4のセットでは、少なくとも R^4 もしくは R^4 のみが、式(1-1)であり、 R^3 および/もしくは R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^4 が式(1-1)であり、 R^3 および/もしくは R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^4 が式(1-1)であり、 R^3 および R^5 の1つもしくは両方が、水素原子である。式(1)の実施形態の第5のセットでは、少なくとも R^5 もしくは R^5 のみが、式(1-1)であり、 R^3 および/もしくは R^4 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^5 が式(1-1)であり、 R^3 および/もしくは R^4 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^5 が式(1-1)であり、 R^3 および R^4 の1つもしくは両方が、水素原子である。一部の実施形態では、上に提供する第1または第2の実施形態のいずれかは、上に提供する第3、第4または第5の実施形態のいずれかと組み合わせる。実施形態の前述の組合せのいずれかでは、 R^6 は、Hまたは CH_3 のいずれかとして選択され得る。実施形態の前述の組合せのいずれかでは、式(1-1)における R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH

、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または式(1-1)における R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または式(1-1)における R^7 、 R^8 および R^9 の1つ、2つもしくはすべてが、水素原子である。

【0040】

特定の実施形態では、式(1)の化合物は、少なくとも R^3 が式(1-1)の構造として選択される、次の構造：

【化13】



を有する。

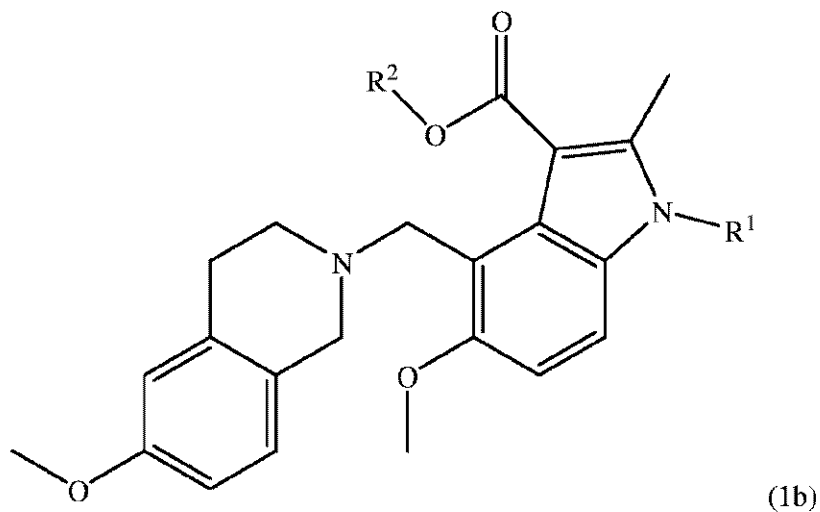
【0041】

上記の式(1a)では、第1、第2および第3の実施形態のいずれかと、これらの相互の組合せならびに R^6 、 R^7 、 R^8 および R^9 の特定の選択とのこれらの組合せとは、式(1)に従った上記のものであり得る。

【0042】

特定の実施形態では、式(1a)の化合物は、次の構造：

【化14】



を有する。

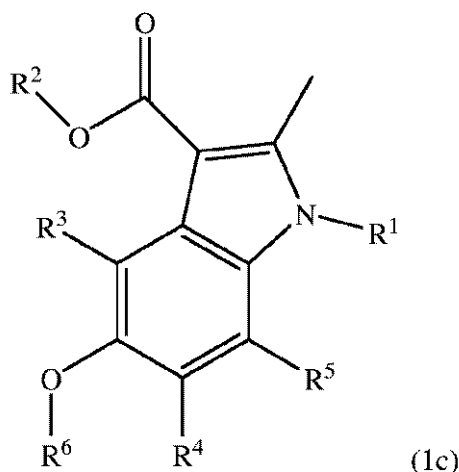
【0043】

上記の式(1b)では、第1および第2の実施形態のいずれかは、 R^1 および R^2 が式(1)に従った上記のものであり得る。

【0044】

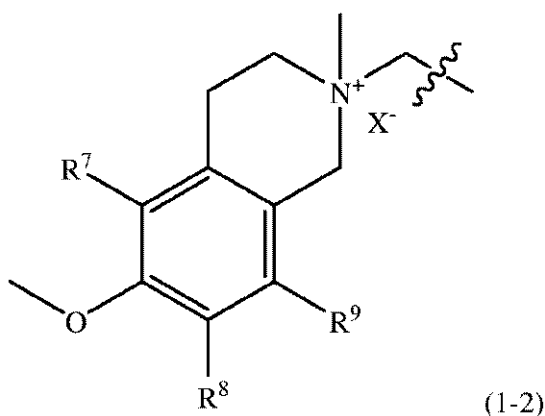
一部の実施形態では、式(1)の化合物は、次の構造：

【化15】



を有するメチル化塩であり、式中、 R^1 は、Hまたは CH_3 であり、 R^2 は、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、 R^3 、 R^4 および R^5 は、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH 、 SCH_3 および次の構造(1-2)：

【化16】



から独立的选择されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つは、式(1-2)の構造であり、 R^6 は、Hまたは CH_3 であり、 R^7 、 R^8 および R^9 は、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的选择される。 R^3 、 R^4 および R^5 のうちの2つが式(1-2)の構造である場合、式(1-2)における R^7 、 R^8 および R^9 は、式(1-1)の2つの場合の間で同一であるか、または異なり得る(すなわち、独立的选择される)。変数 X^- は、化合物の正荷電部分を均衡させるアニオンである。また、式(1c)は、式(1c)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む。

【0045】

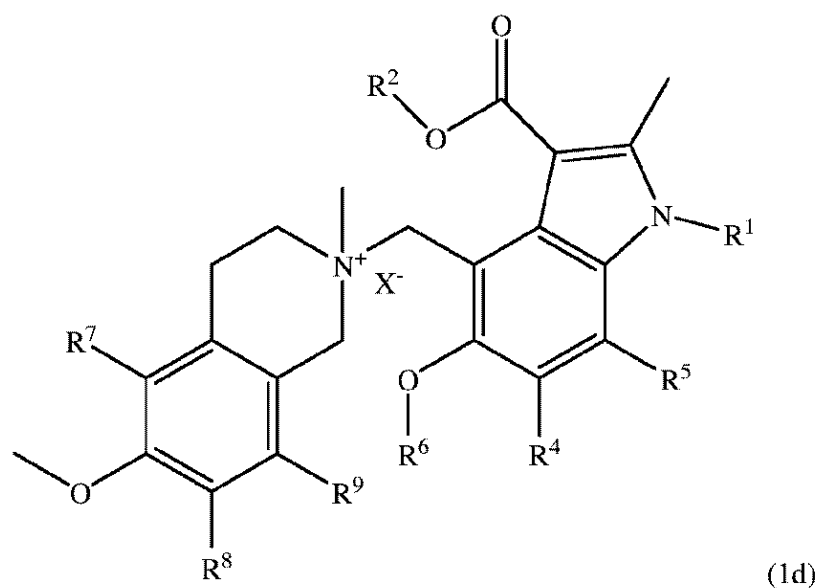
式(1c)の実施形態の第1のセットでは、 R^1 がHであり、 R^2 が、メチル、エチル、 n -プロピルもしくはイソプロピルであるか、または R^1 がHであり、 R^2 が、メチルもしくはエチルであるか、または R^1 がHであり、 R^2 がエチルである。式(1c)の実施形態の第2のセットでは、 R^1 がメチルであり、 R^2 が、メチル、エチル、 n -プロピ

ルもしくはイソプロピルであるか、または R^1 がメチルであり、 R^2 が、メチルもしくはエチルであるか、または R^1 がメチルであり、 R^2 がエチルである。式(1c)の実施形態の第3のセットでは、少なくとも R^3 もしくは R^3 のみが、式(1-2)であり、 R^4 および／もしくは R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^3 が式(1-2)であり、 R^4 および／もしくは R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^3 が式(1-2)であり、 R^4 および R^5 の1つもしくは両方が、水素原子である。式(1c)の実施形態の第4のセットでは、少なくとも R^4 もしくは R^4 のみが、式(1-2)であり、 R^3 および／もしくは R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^4 が式(1-2)であり、 R^3 および／もしくは R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^4 が式(1-2)であり、 R^3 および R^5 の1つもしくは両方が、水素原子である。式(1c)の実施形態の第5のセットでは、少なくとも R^5 もしくは R^5 のみが、式(1-2)であり、 R^3 および／もしくは R^4 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^5 が式(1-2)であり、 R^3 および／もしくは R^4 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^5 が式(1-2)であり、 R^3 および R^4 の1つもしくは両方が、水素原子である。一部の実施形態では、上に提供する第1または第2の実施形態のいずれかは、上に提供する第3、第4または第5の実施形態のいずれかと組み合わせる。実施形態の前述の組合せのいずれかでは、 R^6 は、 H または CH_3 のいずれかとして選択され得る。実施形態の前述の組合せのいずれかでは、式(1-2)における R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または式(1-2)における R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または式(1-2)における R^7 、 R^8 および R^9 の1つ、2つもしくはすべてが、水素原子である。

【0046】

特定の実施形態では、式(1c)のメチル化塩化合物は、次の構造：

【化17】



を有する。

【0047】

上記の式(1d)では、第1、第2および第3の実施形態のいずれかと、これらの相互

【 0 0 4 8 】

【化 1 8】



20

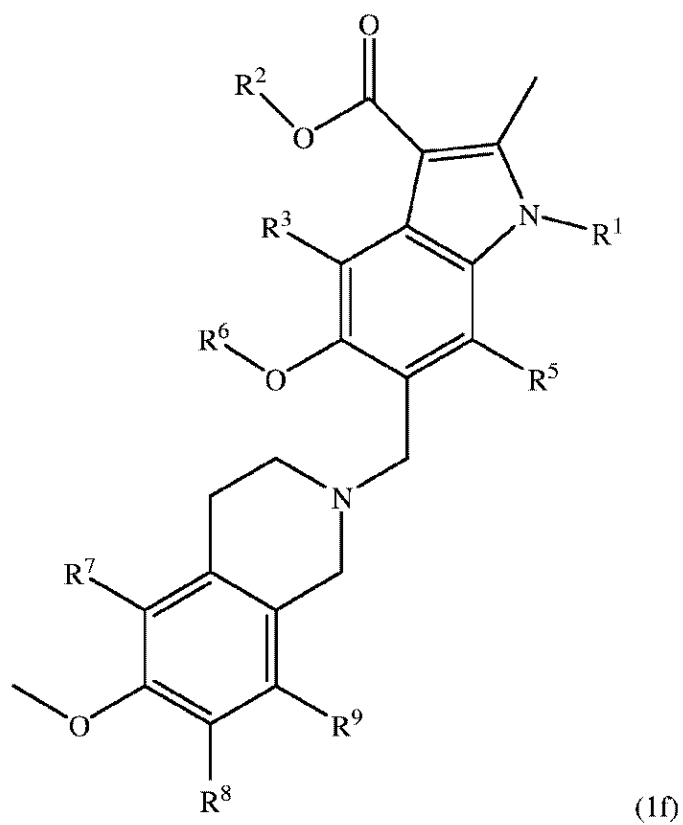
【 0 0 4 9 】

【 0 0 5 0 】

30

40

【化 1 9】



を有する。

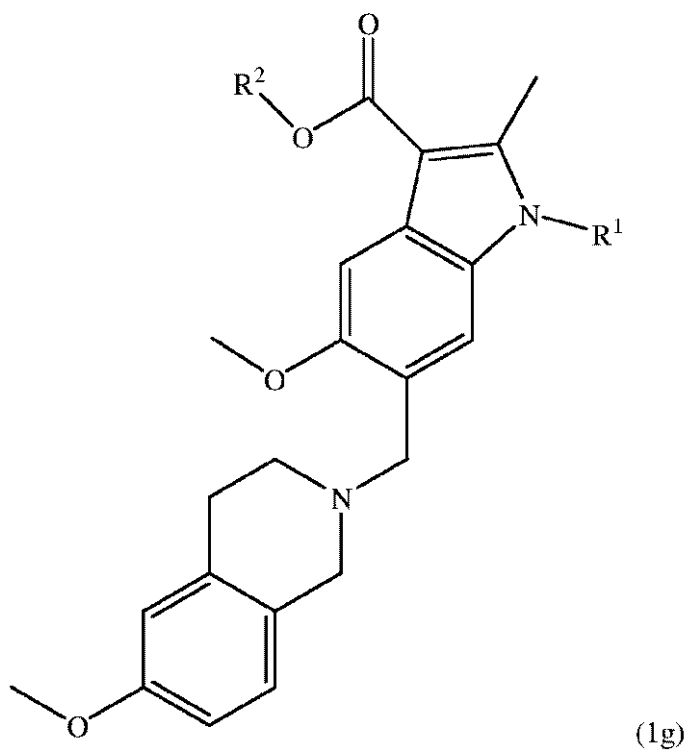
【 0 0 5 1】

上記の式 (1 f) では、第 1、第 2 および第 4 の実施形態のいずれかと、これらの相互の組合せならびに R⁶、R⁷、R⁸ および R⁹ の特定の選択とのこれらの組合せとは、式 (1) に従った上記のものであり得る。

【 0 0 5 2】

特定の実施形態では、式 (1 f) の化合物は、次の構造：

【化 2 0】



を有する。

【0053】

上記の式 (1g) では、第1および第2の実施形態のいずれかは、 R^1 および R^2 が式 (1) に従った上記のものであり得る。

【0054】

他の実施形態では、式 (1) の化合物は、少なくとも R^4 が式 (1-1) の構造として選択される、次のメチル化塩構造：

10

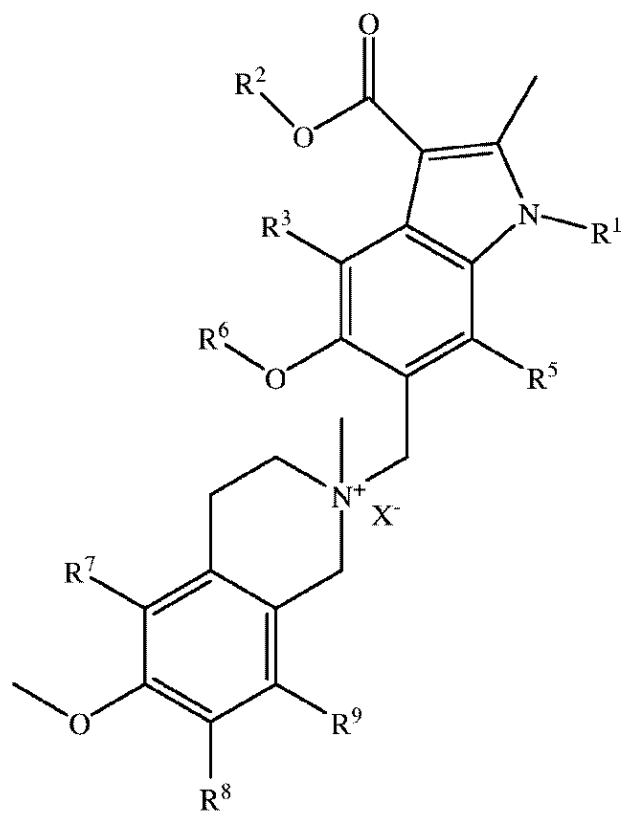
20

30

40

50

【化 2 1】



(1h)

を有する。

【0055】

上記の式(1h)では、第1、第2および第4の実施形態のいずれかと、これらの相互の組合せならびに R^6 、 R^7 、 R^8 および R^9 の特定の選択とのこれらの組合せとは、式(1)に従った上記のものであり得る。

【0056】

特定の実施形態では、式(1h)の化合物は、次の構造：

10

20

30

40

50

10



【 0 0 5 7 】

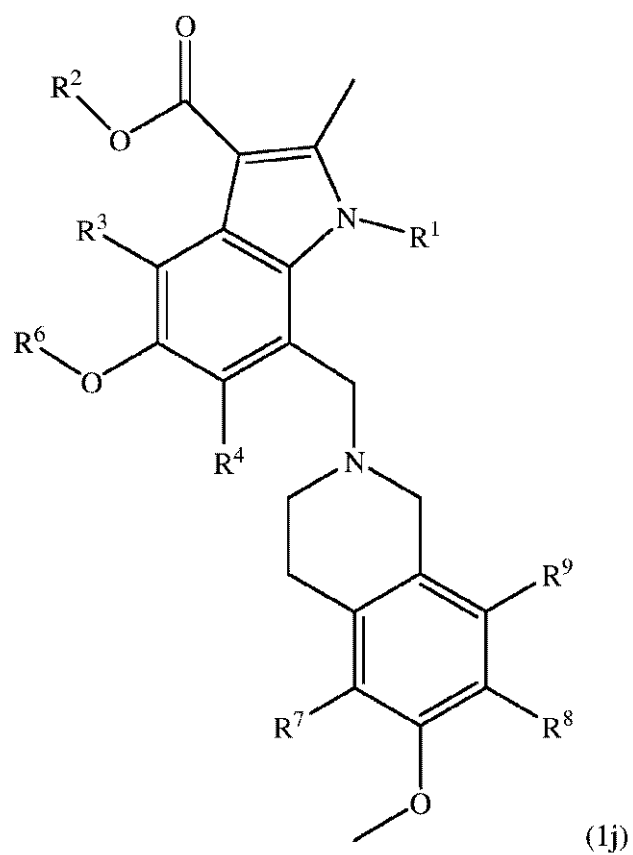
【 0 0 5 8 】

30

40

50

【化 2 3】



を有する。

【0059】

上記の式(1j)では、第1、第2および第5の実施形態のいずれかと、これらの相互の組合せならびにR⁶、R⁷、R⁸およびR⁹の特定の選択とのこれらの組合せとは、式(1)に従った上記のものであり得る。

【0060】

特定の実施形態では、式(1j)の化合物は、次の構造：

10

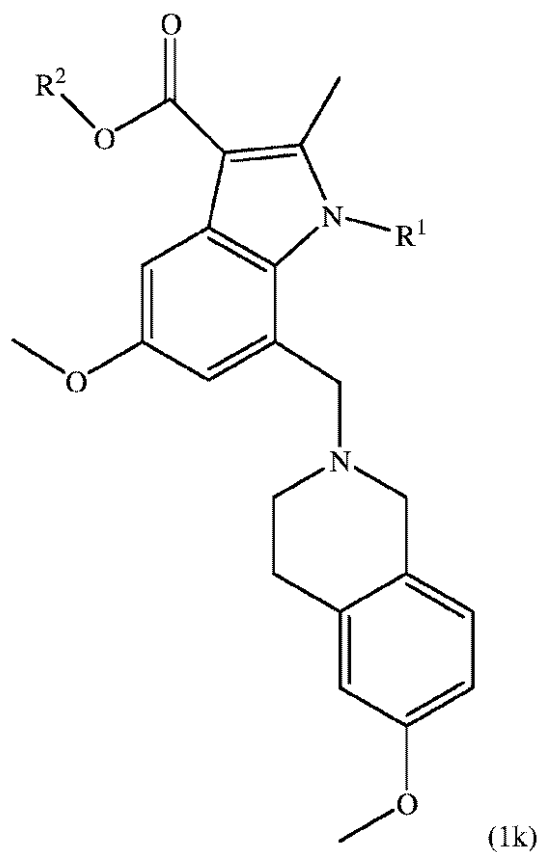
20

30

40

50

【化 2 4】



を有する。

【 0 0 6 1】

上記の式 (1 k) では、第 1 および第 2 の実施形態のいずれかは、 R^1 および R^2 が式 (1) に従った上記のものであり得る。

【 0 0 6 2】

他の実施形態では、式 (1) の化合物は、少なくとも R^5 が式 (1-1) の構造として選択される、次のメチル化塩構造：

10

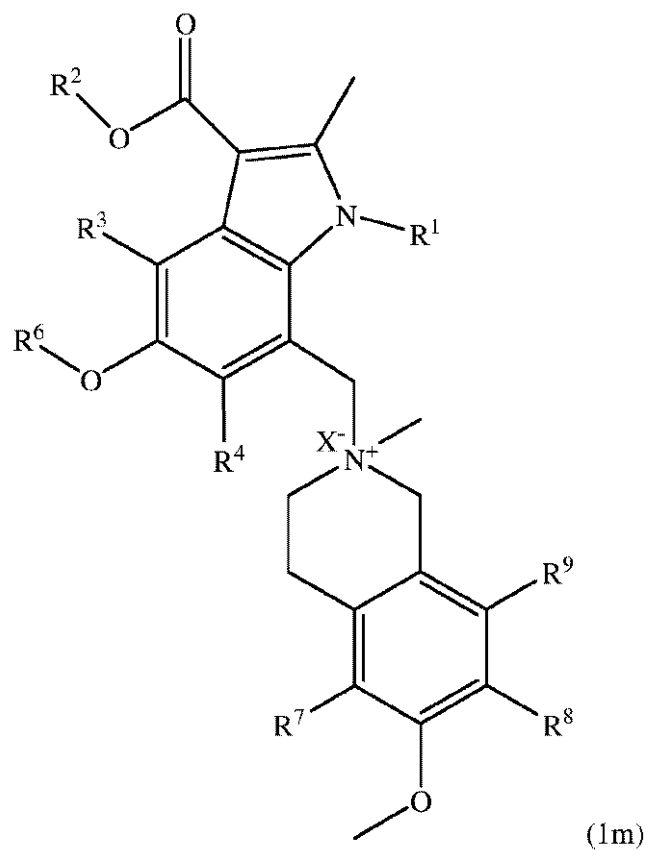
20

30

40

50

【化 2 5】



を有する。

【0063】

上記の式(1m)では、第1、第2および第5の実施形態のいずれかと、これらの相互の組合せならびに R^6 、 R^7 、 R^8 および R^9 の特定の選択とのこれらの組合せとは、式(1)に従った上記のものであり得る。

【0064】

特定の実施形態では、式(1m)の化合物は、次の構造：

10

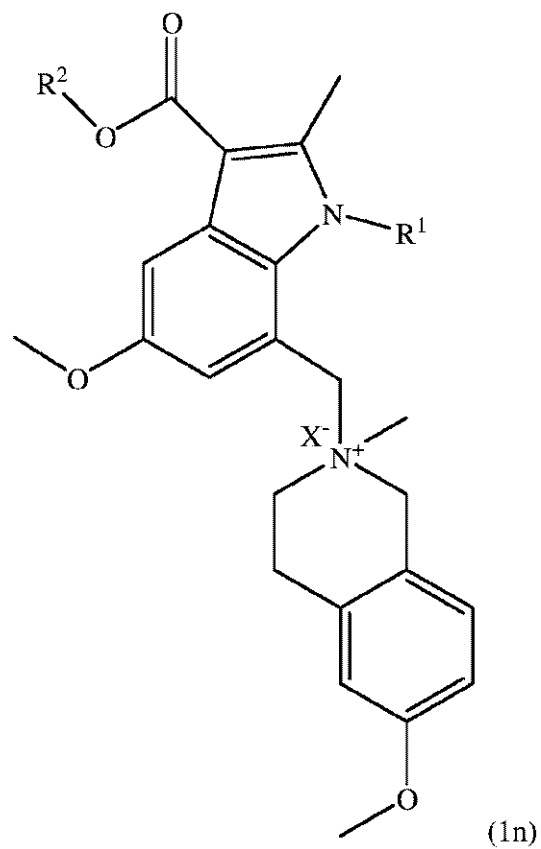
20

30

40

50

【化 2 6】



を有する。

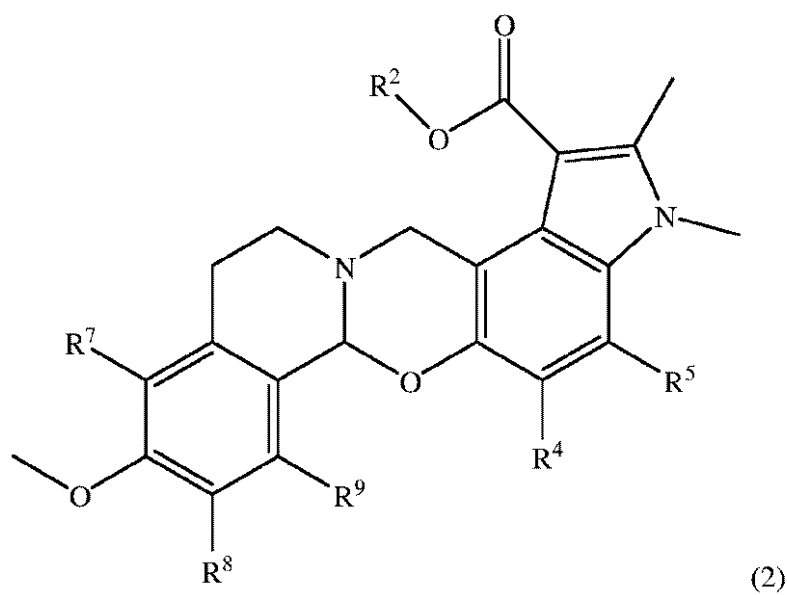
【 0 0 6 5】

上記の式 (1 n) では、第 1 および第 2 の実施形態のいずれかは、 R^1 および R^2 が式 (1 c) に従った上記のものであり得る。

【 0 0 6 6】

実施形態の別のセットでは、M 4 アンタゴニスト化合物は、次の構造：

【化 2 7】



を有する。

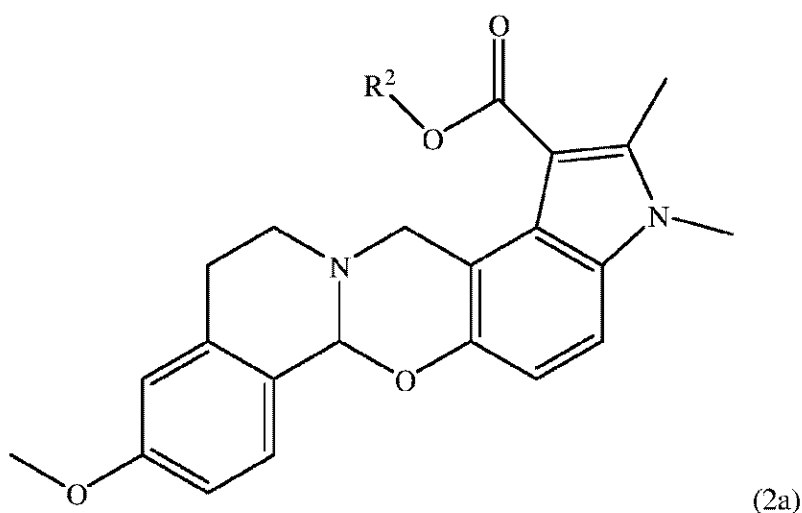
【0067】

上記の式(2)では、 R^2 、 R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^8 および R^9 は、上記の式(1)の下に定義するものである。また、式(2)は、式(2)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む。式(2)の実施形態の第1のセットでは、 R^2 が、メチル、エチル、*n*-プロピルもしくはイソプロピルであるか、または R^2 が、メチルもしくはエチルであるか、または R^2 がエチルである。式(2)の実施形態の第2のセットでは、 R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^4 および R^5 の1つもしくは両方が、水素原子である。一部の実施形態では、上に提供する第1または第2の実施形態のいずれかを組み合わせる。実施形態の前述の組合せのいずれかでは、 R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^7 、 R^8 および R^9 の1つ、2つもしくはすべてが、水素原子である。

【0068】

特定の実施形態では、式(2)の化合物は、次の構造：

【化28】



を有する。

【0069】

上記の式(2a)の特定の実施形態では、 R^2 が、メチル、エチル、*n*-プロピルもしくはイソプロピルであるか、または R^2 が、メチルもしくはエチルであるか、または R^2 がエチルである。

【0070】

実施形態の別のセットでは、M4アンタゴニスト化合物は、次の構造：

10

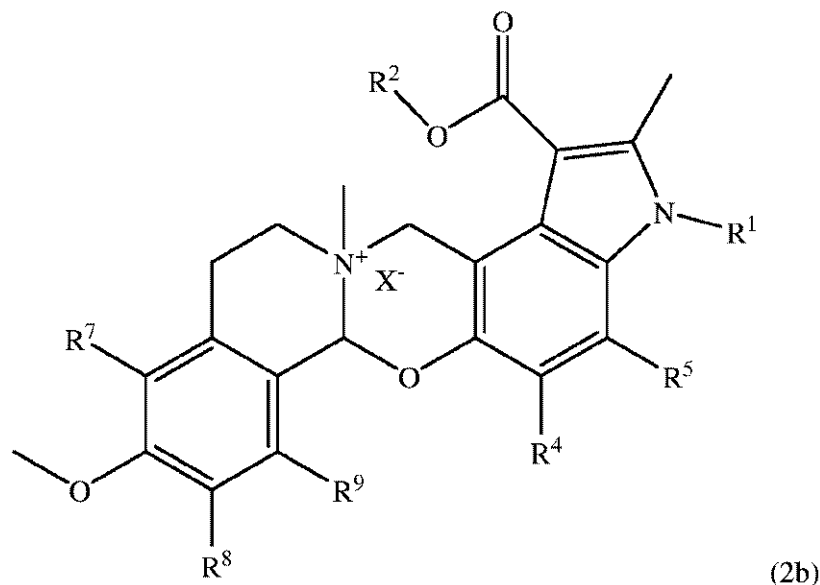
20

30

40

50

【化 2 9】



を有する。

【0071】

上記の式(2b)では、 R^1 、 R^2 、 R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^8 および R^9 は、上記の式(1)の下に定義するものである。また、式(2b)は、式(2b)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む。一部の実施形態では、式(2b)は、ラセミ混合物を表し、他の実施形態では、式(2b)は、 R もしくは S 、または $(+)$ もしくは $(-)$ 光学形態と名付けられ得る、単一のエナンチオマーを表す。変数 X^- は、化合物の正荷電部分を均衡させるアニオンである。

【0072】

式(2b)の実施形態の第1のセットでは、 R^1 がHであり、 R^2 が、メチル、エチル、 n -プロピルもしくはイソプロピルであるか、または R^1 がHであり、 R^2 が、メチルもしくはエチルであるか、または R^1 がHであり、 R^2 がエチルである。式(2b)の実施形態の第2のセットでは、 R^1 がメチルであり、 R^2 が、メチル、エチル、 n -プロピルもしくはイソプロピルであるか、または R^1 がメチルであり、 R^2 が、メチルもしくはエチルであるか、または R^1 がメチルであり、 R^2 がエチルである。式(2b)の実施形態の第3のセットでは、 R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^4 および R^5 の1つもしくは両方が、水素原子である。一部の実施形態では、上に提供する第1または第2の実施形態のいずれかは、実施形態の第3のセットのいずれかと組み合わせる。実施形態の前述の組合せのいずれかでは、 R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択されるか、または R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 および CF_3 から独立的に選択されるか、または R^7 、 R^8 および R^9 の1つ、2つもしくはすべてが、水素原子である。

【0073】

特定の実施形態では、式(2b)の化合物は、次の構造：

10

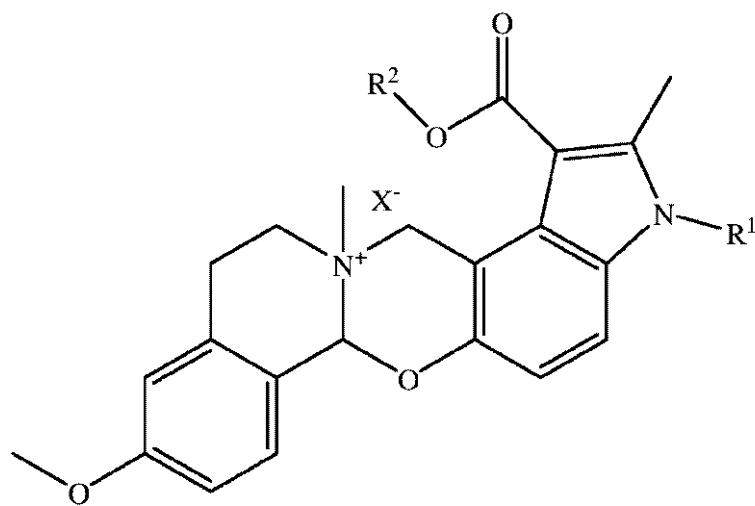
20

30

40

50

【化 30】



(2c)

を有する。

【0074】

上記の式(2c)では、第1および第2の実施形態のいずれかは、 R^1 および R^2 が式(2b)に従った上記のものであり得る。

【0075】

一部の実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、M4への結合について少なくとも $6.0 \times 10^{-6} M$ の pK_i を有する。一部の実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、M1/M4、M2/M4、M3/M4およびM5/M4のいずれか1つ、2つ、3つまたはすべてについて、少なくとも5倍、10倍、15倍、20倍または25倍の選択性を有する。

【0076】

本明細書において記載する化合物は、薬学的に許容される塩として形成および／または使用し得る。薬学的に許容される塩は、求電子有機種または薬学的に許容される有機もしくは無機酸との中性化合物（すなわち、インドリルおよび／またはイソキノリニル環上に環窒素を有する）の反応から生じ得る。この方法では、インドリルおよび／またはイソキノリニル環窒素の1つまたは両方は、プロトン化またはアルキル化される。求電子有機種の一部の例としては、ハロゲン化アルキル、例えば、臭化メチル、臭化エチル、臭化n-プロピルおよび臭化イソプロピルが挙げられる。有機酸の一部の例としては、酢酸、プロピオン酸、ブタン酸、グリコール酸、ピルビン酸、乳酸、マロン酸、リンゴ酸、クエン酸、コハク酸、マレイン酸、酒石酸、フマル酸、トリフルオロ酢酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、1,2-エタンジスルホン酸、2-ヒドロキシエタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、トルエンスルホン酸、2-ナフタレンスルホン酸、3-フェニルプロピオン酸、トリメチル酢酸、グルコン酸、グルタミン酸、サリチル酸、ヒドロキシナフトエ酸、ステアリン酸、ムコン酸等が挙げられる。無機酸の一部の例としては、塩酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸、メタリン酸等が挙げられる。アニオン(X^-)は、上記の酸もしくは求電子種と関連するアニオンのいずれかであり得るか、またはアニオンは、当技術分野の他の任意の薬学的に許容されるアニオンとのこの交換から生じ得る。

【0077】

一部の実施形態では、薬学的に許容される塩は、 R^6 が水素原子である場合、 R^6 の脱プロトン化から生じ得る。脱プロトン化は、フェノールの脱プロトン化に適する強度の塩基（すなわち、 $-OR^6$ 基）との中性化合物の反応により典型的に生じる。塩基は、例えば、アルカリ金属（例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム）の水酸化物、アルカリ土

類金属（例えば、マグネシウムまたはカルシウム）の水酸化物、またはアルミニウムの水酸化物であり得る。

【0078】

また、上記の化合物のいずれかは、溶媒和物であり得る。当技術分野において公知のように、溶媒和物は、1つまたは1つより多くの溶媒分子の付加化合物である。本発明の目的では、溶媒分子は、薬学的に許容されるべきである。薬学的に許容される溶媒分子の一部の例としては、水、アルコール（例えば、エタノール）およびグリコール（例えば、エチレングリコールおよびプロピレングリコール）が挙げられる。溶媒分子が水の場合では、溶媒和物は、典型的に水和物と呼ぶ。また、化合物は、任意の多形形態、例えば、アモルファス、単結晶または多結晶形態であり得る。また、結晶形態は、例えば、結晶充填および結晶学的（対称性）空間群により決定される、いくつかの可能な結晶形態の1つであり得る。薬学的溶媒和物、水和物、多形および結晶形態は、例えば、A. M. Healy et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 117, 25-46, 2017およびS. L. Morissette et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 275-300, 2004に記載されており、この内容は本明細書において、この全体を参照により組み込む。

【0079】

M4特異的アンタゴニストを含む医薬組成物

【0080】

典型的には、M4アンタゴニスト化合物を被験体に投与可能とするために、化合物は、医薬組成物の技術分野において周知のように、1つまたは1つより多くの薬学的に許容される担体（添加剤）および／または希釈剤とともに製剤化する。本発明の医薬組成物は、固体または液体形態での投与のために特別に製剤化してもよく、次の投与：（1）経口投与、例えば、飲薬（水性または非水性溶液または懸濁液）、錠剤、例えば、頬側、舌下および全身性吸収を目的とするもの、ボラス、粉剤、顆粒剤、舌への適用のための糊状剤、（2）非経口投与、例えば、滅菌溶液もしくは懸濁液として、例えば、皮下、筋肉内、静脈内もしくは硬膜外注射によるもの、または持続放出製剤、（3）局所適用、例えば、クリーム、軟膏もしくは調節放出パッチ、または皮膚に適用するスプレーとして、（4）舌下投与、（5）眼内投与、（6）経皮投与、あるいは（7）経鼻投与のために構成されたものを含む。

【0081】

「薬学的に許容される」という句は、良識ある医学的判断の範囲内において、好ましくは、重要な毒性、刺激作用またはアレルギー応答がなく、生体または生体組織に侵入させるのに適する、このような化合物、物質、組成物、および／または剤形を指すために本明細書において使用する。「薬学的に許容される担体」という句は、本明細書において使用する場合、活性物質の体内への導入に有用な薬学的に許容される組成物、例えば、液体または固体のフィラー、希釈剤、製造補助剤（例えば、滑沢剤、タルク ステアリン酸マグネシウム、カルシウムもしくは亜鉛、またはステアリン酸（steric acid））または溶媒封入物質を一般に指す。各担体は、製剤の他の成分と適合し、患者に対して有害でないという点において「許容され」なければならない。本発明の医薬組成物において利用し得る、適する水性および非水性担体の例としては、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、植物油（例えば、オリーブ油）および注射用有機エステル（例えば、オレイン酸エチル）ならびにこれらの混合物が挙げられる。適切な流動性は、例えば、コーティング物質、例えば、レシチンの使用により、分散させる場合では、必要とされる粒子サイズの維持により、および界面活性物質の使用より、維持することができる。

【0082】

薬学的に許容される担体として働き得る物質の他の例としては、（1）糖、例えば、ラクトース、グルコースおよびスクロース、（2）デンプン、例えば、コーンスターチおよびジャガイモデンプン、（3）セルロースおよびこの誘導体、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、エチルセルロースおよび酢酸セルロース、（4）トラガント粉末

、(5) 麦芽、(6) ゼラチン、(7) タルク、(8) 賦形剤、例えば、カカオバターおよび坐薬用ワックス、(9) 油、例えば、ピーナツ油、綿実油、ベニバナ油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油およびダイズ油、(10) グリコール、例えば、プロピレングリコール、(11) ポリオール、例えば、グリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール、(12) エステル、例えば、オレイン酸エチルおよびラウリン酸エチル、(13) 寒天、(14) 緩衝剤、例えば、水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム、(15) アルギン酸、(16) 発熱物質不含水、(17) 等張食塩水、(18) リンゲル溶液、(19) エチルアルコール、(20) pH緩衝溶液、(21) ポリエステル、ポリカーボネートおよび／またはポリ酸無水物、ならびに(22) 医薬製剤に利用される他の非毒性適合物質が挙げられる。

10

【0083】

錠剤は、必要に応じて、1つまたは1つより多くの補助成分とともに、圧縮または成型により製造され得る。圧縮錠剤は、結合剤（例えば、ゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、滑沢剤、不活性希釈剤、保存剤、崩壊剤（例えば、デンプングリコール酸ナトリウムまたは架橋カルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤または分散剤を使用して調製し得る。錠剤、および活性物質の他の固形剤形、例えば、カプセル、丸剤および顆粒剤は、必要に応じて、コーティングおよびシェル、例えば、腸溶コーティングおよび医薬製剤技術において周知の他のコーティングを用いて印を付けるかまたは調製する。また、剤形は、この中の活性成分の徐放または調節放出をもたらすように製剤化してもよく、例えば、所望の放出プロファイルをもたらす種々の割合のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他のポリマーマトリクス、リポソームおよび／またはマイクロスフィアを使用する。あるいは、剤形は、速放のために製剤化し得る。

20

【0084】

M4特異的アンタゴニストの使用

【0085】

一実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ4（M4）活性から生じる疾患または状態、例えば、貧血を処置するために、被験体に投与する。用語「処置すること」（*treating*）または処置（*treatment*）」は、本明細書において使用する場合、寛解、増悪の減速、矯正、予防、または疾患もしくは状態の再発の遅延を含む。例えば、貧血の処置により、ヘモグロビン、ヘマトクリットおよび／または赤血球（RBC）数のレベルの回復または維持により反映されるように、貧血に関連する1つまたは1つより多くの症候（例えば、疲労、息切れ）を含む貧血の重症度が低下し得る。

30

【0086】

一部の実施形態では、貧血または他の疾患もしくは状態を処置する方法は、薬学的有効量のM4アンタゴニストを、それを必要とする被験体に投与することにより達成する。M4特異的アンタゴニストは、式（1）および（2）ならびにこれらの部分式の範囲内の構造のいずれかを含む、上記のM4アンタゴニスト化合物のいずれかであり得る。

【0087】

この処置を必要とする被験体は、貧血またはM4活性から生じる他の疾患もしくは状態に罹患しているか、またはこのリスクを有する任意の被験体、特に、ヒト被験体を含む。一部の実施形態では、被験体は、Epoの投与により所望の応答が生じないか、または所望の応答を生じることが予想されない貧血であるEpo抵抗性貧血に罹患している。被験体における貧血がEpo抵抗性か否かは、組換えヒトEPOによる標準処置後の被験体におけるHbまたはヘマトクリットの評価により判定することができる。例えば、被験体における貧血は、組換えヒトEPOによる標準処置を受けた後に被験体が、少なくとも12 g/dLのHbレベルに達することが不可能であるか、2 g/dLを超えるHbレベルの上昇を達成不可能であるか、または少なくとも10 g/dLのHb濃度の維持が不可能である場合、Epo抵抗性貧血であるとみなされる。別の例として、被験体における貧血は、組換えヒトEPOによる標準処置を受けた後に被験体が、ヘマトクリットを少なくと

40

50

も30%、32%、34%、36%または38%に上昇させることが不可能である場合、Epo抵抗性貧血であるとみなされる。

【0088】

被験体における貧血は、種々の原因から生じ得る。一部の実施形態では、被験体における貧血は、溶血に関連する（すなわち、溶血性貧血）。一部の実施形態では、被験体における貧血は、骨髄異形成症候群（MDS）に関連する。一部の実施形態では、被験体における貧血は、老化に関連する。したがって、一部の実施形態では、この処置は、少なくとも60、65、70、75、80または85歳のヒト被験体に提供する。他の実施形態では、貧血は、例えば、外科手術、化学療法または放射線療法を受けることが予想される被験体におけるものであることが予想される。また、M4アンタゴニストは、貧血として専門的には認定されない可能性があるが、貧血様症候により特徴づけられる、状態または疾患を処置するために使用し得る。溶血モデルでは、化合物の一般的抗貧血活性を*in vivo*で確認することが可能である。

【0089】

M4特異的アンタゴニストは、それを必要とする被験体に、治療有効量（すなわち、治療的に有効な投与量）で投与する。「治療有効量」または「治療的に有効な投与量」という用語は、本明細書において使用する場合、好ましくは、被験体に対する実質的な毒性作用がなく、上記の所望の治療作用のいずれかをもたらすのに有効な活性物質の量に相当する。特定の実施形態では、有効量は、所望のレベルへのHb、ヘマトクリットもしくはRBC数における上昇、または所望の量によるHb、ヘマトクリットもしくはRBC数の上昇、あるいはより詳細には、1つまたは1つより多くの貧血症候の減少を達成するのに十分な量である。有効とするための正確な量は、化合物の構造および薬理学的プロファイルに応じて異なり得る。例えば、培養下のBFU-Eの自己複製および増殖に対する作用、ならびに薬理学的特性（例えば、血漿における半減期）を評価することにより、M4特異的アンタゴニストを評価して、このようなアンタゴニストの有効量を決定することが有用であり得る。一部の実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、単回用量で投与する。一部の実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、複数回用量、例えば、1日に、1日置きに、毎週、隔週または毎月、2、3またはこれよりも多い回数で投与する。特に、全身的投与方法では、投与量は、例えば、1日に体重1kgあたり約0.01、0.1、0.5、1、5または10mg〜1日もしくは隔日に、または1日に2、3、4もしくはそれよりも多い回数、体重1キログラムあたり約20、50、100、500または1000mgの範囲であり得る。一般には、低分子化合物の有効量は、1日、1週間または1か月に、1回または複数回、1μg〜5000mg、10μg〜1000mg、10μg〜10mg、100μg〜500μgの範囲内であり得る。一部の実施形態では、用量は、約1、5、10、20、50、100μg/kg/日もしくは1、5、10、15、20、50、100、150、200mg/kg/日の範囲、または規定用量間の値の範囲の任意の値に及び得る。

【0090】

M4特異的アンタゴニストは、経口、経鼻、経皮、非経口（例えば、静脈内、腹腔内、皮内、皮下または筋肉内）経路を含む標準経路により、被験体に投与することができる。特定の実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、経口投与により被験体に与えられる。

【0091】

M4特異的アンタゴニストは、適する投与のための薬学的に許容される担体とともに用意または混合することができる。上に考察するように、薬学的に許容される担体は、あらゆる溶媒、分散媒、等張剤等を含む。担体は、液体、半固体、例えば、糊状、または固体の担体であり得る。担体の例としては、油、水、食塩溶液、アルコール、糖、ゲル、脂質、リポソーム、樹脂、多孔性マトリクス、結合剤、フィラー、コーティング、保存剤等、またはこれらの組合せが挙げられる。

【0092】

他の実施形態では、M4特異的アンタゴニストは、赤芽球バースト形成単位（BFU-

E) 細胞の自己複製を、B F U - E 細胞を M 4 特異的アンタゴニストと接触させることにより促進させるために利用する。B F U - E 細胞は、例えば、M 4 特異的アンタゴニストと接触させるときに、生体（例えば、ヒト）被験体内に存在し得るか、または B F U - E 細胞は、被験体から採取して、M 4 特異的アンタゴニストと *ex vivo* で接触させ得る。M 4 特異的アンタゴニストは、上記の M 4 特異的アンタゴニストのいずれかを含む、任意の M 4 特異的アンタゴニストであり得る。特定の実施形態では、B F U - E 細胞の自己複製の増加を利用して、被験体における貧血を処置する。一部の実施形態では、B F U - E 細胞の自己複製は、M 4 特異的アンタゴニストと接触させた結果として、少なくとも 50%、100%、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、10 倍またはこれよりも高く増加する。

10

【0093】

実施例は、例示目的のため、および本発明のある特定の実施形態を記載するために以下に記載している。ただし、本発明の範囲は、本明細書に記載する実施例により、決して制限されるべきではない。引用するすべての参照の内容（本出願を通して引用する参考文献、発行された特許、および公開された特許出願を含む）は、本明細書によって、参照により明示的に組み込む。

【実施例】

【0094】

(実施例 1)

この実施例では、B F U - E 自己複製におけるムスカリン性アセチルコリン受容体 C H R M 4 経路の役割、および低分子ムスカリン性アセチルコリン受容体阻害物質である臭化オキシフェノニウムの、マウスモデルにおける貧血に対する作用を検討するために行った実験を記載する。

20

【0095】

結果

【0096】

B F U - E の自己複製を制御する G タンパク質共役受容体（「GPCR」）を同定するために、B F U - E において豊富に発現する GPCR に焦点を合わせて、全ゲノム遺伝子発現プロファイルを解析した。B F U - E 自己複製の、分化に対する制御に機能的に重要である可能性が最も高い GPCR の候補リストをさらに絞り込むために、発明者らは、分化および自己複製が、おそらく対照的な遺伝子発現プロファイルを有する、対立する 2 つの細胞運命であるという概念を利用した。

30

【0097】

調査した創薬可能な GPCR 358 種の中でも、P 2 r y 2、G p r 1 2 4 および C a l c r l を含む 3 つの GPCR が、B F U - E の分化において下方制御され、自己複製において上方制御されることを見出し、C h r m 4、F z d 5 および D a r c を含む 3 つの GPCR が、B F U - E の分化において上方制御され、自己複製において下方制御されることを見出した。B F U - E の自己複製において上方制御された GPCR では、このような GPCR のアゴニストとして作用する低分子化合物を試験し、B F U - E の自己複製において下方制御された GPCR では、B F U - E の自己複製および増殖を促進するその能力について、アンタゴニストを試験した。試験したすべての低分子化合物の中でも、密接に関連する 2 つのムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストである臭化オキシフェノニウムおよびクエン酸オルフェナドリンにより、B F U - E の増殖が引き起こされた（図 1 A ~ 1 B）。

40

【0098】

1 つの B F U - E により、赤血球が約 500 個生成されることがこれまでに示されている。100 μ M の臭化オキシフェノニウムの存在下で培養すると、B F U - E は、長期の増殖を経て、さらに約 10 倍の赤血球が産生された（図 1 A ~ 1 B）。12 日の培養の後、大多数の培養細胞が最終分化を経ると、臭化オキシフェノニウムの有無による培養条件間で T e r 1 1 9 + 分化細胞のパーセンテージにおける差は存在せず、すべての細胞が、

50

臭化オキシフェノニウムの有無による培養条件下で、T e r 1 1 9 + 分化赤血球系列細胞であることを示唆した（図 1 C）。図 1 D に示すように、培養 6 日目の B F U - E をメチルセルロース培地上に播種し、9 日後、形成された B F U - E コロニー数を計数した。臭化オキシフェノニウムの存在により、約 2 倍の B F U - E コロニー形成が引き起こされた。ヒト C D 3 4 + 造血幹細胞および前駆細胞（H S P C）培養系では、臭化オキシフェノニウムにより、赤血球細胞の増殖も約 2 倍～4 倍促進された（図 1 E）。まとめると、これは、ムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストである臭化オキシフェノニウムにより、B F U - E 自己複製を促進させることによって赤血球の産生が増加することを示唆する。

【0099】

C h r m 4 が、B F U - E において発現するムスカリン性アセチルコリン受容体ファミリーの最も豊富なメンバーであることを本明細書において示した（図 2 A）。試験したすべての細胞型の中でも、C h r m 4 の機能的役割が十分に確立されている網膜細胞のすぐ後に次いで、赤血球前駆細胞が、C h r m 4 を 2 番目に最も豊富に発現することが見出された。C h r m 4 は、B F U - E から C F U - E の段階への赤血球分化において上方制御され、自己複製において下方制御されることが見出された（図 2 A）。図 2 B ～ 2 D に示すように、C h r m 4 を標的とする 2 つの独立的 s h R N A を使用する C h r m 4 のノックダウンにより、B F U - E の増殖が促進された。対照 s h R N A をコードするウイルスを感染させた 1 つの B F U - E により、赤血球細胞が約 1 0 0 個産生され、一方、C h r m 4 を標的とする s h R N A をコードするウイルスを感染させた B F U - E により、さらに約 3 ～ 5 倍の赤血球細胞が産生された。これにより、臭化オキシフェノニウムの B F U - E 増殖に対する好ましい作用が再現される（図 1 B）。これと一致して、C h r m 4 のノックダウンにより、自己複製マーカー、例えば、Z f p 3 6 l 2 の発現も上方制御された（図 2 E）。

【0100】

ムスカリン性アセチルコリンアンタゴニストにより、環状 AMP（c AMP）レベルを上昇させること、および C R E B 転写プログラムを制御することによって C H R M 4 経路が阻害されることが報告されている（Kruse et al., Nat Rev Drug Discov 13, 549-560 (2014); Wess et al., Nat Rev Drug Discov 6, 721-733 (2007); Shaywitz, Annu Rev Biochem 68, 821-861 (1999)）。これと一致して、アデニル酸シクラーゼ活性化物質であるフォスコリンを用いた B F U - E の培養物により、B F U - E の増殖が促進されることを本明細書において示した（図 3 A）。加えて、リン酸化 C R E B は、臭化オキシフェノニウムによる処理時に核局在化の増加を呈した（図 3 B）。このような結果は、C R E B が、高齢者において再生、ならびに幹細胞および前駆細胞枯渇矯正のための因子として役立ち得ることを示唆する。

【0101】

C R E B の直接標的遺伝子を同定するために、B F U - E に対して C h I P - S e q を実施した。RNA 結合タンパク質 Z F P 3 6 L 2 は、赤血球の分化において誘導される遺伝子の mRNA に優先的に結合して、これらの分解を引き起こし、次いで、自己複製に寄与することが報告されている。Z F P 3 6 L 2 とは対照的に、C R E B は、B F U - E において高度に発現する遺伝子付近のゲノム遺伝子座に優先的に結合して（図 3 C）、このような遺伝子の上方制御を引き起こし（図 3 D）、これにより C R E B が B F U - E の前駆状態の維持に寄与すると考えられることが見出された。このような遺伝子は、赤血球前駆細胞の増殖を誘導するのに十分な転写因子 G a t a 2（図 3 E）（Tsai et al., Blood, 89, 3636-3643 (1997)）および B F U - E の前駆状態の維持に不可欠な RNA 結合タンパク質 Z f p 3 6 l 2（Zhang et al., Nature 499, 92-96 (2013)）を含む。まとめると、このような結果は、C H R M 4 - C R E B 経路により、B F U - E の前駆状態の維持に重要な遺伝子の発現が上方制御されることによって B F U - E の自己複製が促進されることを示す。

【0102】

要約すると、上記の実験では、ムスカリン性アセチルコリン受容体CHRM4経路が、BFUE自己複製の重大な制御因子であり、ムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストである臭化オキシフェノニウムにより、BFUEの自己複製および増殖が引き起こされることが示された。また、実験では、溶血、MDSおよび老化マウスモデルにおいて、ムスカリン性アセチルコリン受容体アンタゴニストにより、*in vivo*において貧血が矯正されることが示された。加えて、実験では、下流転写因子であるCREBにより、BFUE自己複製の促進におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の作用が媒介されることが示された。

【0103】

材料および方法

【0104】

初代マウスBFUEを胎生期14.5日(E14.5)のマウス胎仔肝臓から単離してStemSpan無血清増殖培地中で培養し、形成された細胞数を培養下で計数した。対照shRNAをコードするウイルスまたはChrm4を標的とするshRNAをコードするウイルスのいずれかをBFUEに感染させ、培養下で形成されたGFP+細胞数を計数した。DMSOまたは25mg/kgの臭化オキシフェノニウムを、溶血マウスモデル、Mx1-cre Srsf2 P95H/WT MDSマウスモデル、および老化マウスモデルに腹腔内注射した。化合物注射後に全血球計算(CBC)を実施した。100μMの臭化オキシフェノニウムによる45分間の培養後にBFUEに対してCREBのChIP-Seqを実施した。DMSOまたは臭化オキシフェノニウムによる3日間の培養後にBFUEにおいてRNA-Seqを実施した。

【0105】

BFUE単離および培養系

【0106】

これまでに記載されている蛍光活性化細胞分類(FACS)法を使用して(Flygare et al., Blood 117, 3435-3444 (2011))、BFUEを胎生期14.5日のマウス胎仔肝臓から単離した。rmSCF(100ng/ml)、EPO(2U/ml)、rmIGF-1(40ng/ml)、デキサメタゾン(1nmol/mlまたは10nmol/ml)、臭化オキシフェノニウム(100μmol/ml)およびクエン酸オルフェナドリン(1μmol/ml)を含むStemSpan SFEM II培地中で、BFUEを培養した。

【0107】

BFUEコロニー形成、Ter119抗体染色およびレトロウイルス感染アッセイ

【0108】

3日の培養後、培養細胞をメチルセルロース培地MethoCult SF M3436中に置き、9日後にBFUEコロニーを計数した。培養14日目に、培養細胞をTer119-APC抗体で染色し、Ter119+細胞のパーセンテージをフローサイトメトリーにより測定した。レトロウイルス感染では、対照shRNAまたはChrm4を標的とするshRNAのいずれかをコードするウイルスを、BFUEに感染させた。

【0109】

ヒトCD34+細胞培養、計数およびコロニー形成アッセイ

【0110】

rhSCF(20ng/ml)、rhIL-3(5ng/ml)およびEPO(1U/ml)を含むStemSpan(商標)SFEM培地中で、種々の濃度のデキサメタゾンおよびオキシフェノニウムとともにヒトCD34+造血幹細胞および前駆細胞(HSPC)を培養した。細胞の総数は、フローサイトメトリーを使用して計数した。コロニー形成アッセイでは、8日目の培養細胞をメチルセルロース培地MethoCult(商標)H4034 Optimum中に置き、13日後にBFUEコロニーを計数した。

【0111】

PHZにより溶血性貧血マウスモデルが誘導された

10

20

30

40

50

【0112】

4～6週齢のC57b1/6マウスに、対照DMSOまたは化合物のいずれかを3日間毎日腹腔内注射した。4日目に、マウスに60mg/kgのPHZを腹腔内注射した。次いで、マウスに化合物または対照DMSOのいずれかをさらに3日間毎日腹腔内注射した。末梢血試料を後眼窩からヘパリン処理毛細管チューブを使用してK2-EDTAを有する血液採取チューブ内に採取した。Hemavet（登録商標）950を使用してCBCを実施した。

【0113】

脾臓細胞のBFU-Eコロニー形成およびフローサイトメトリーアッセイ

【0114】

4～6週齢のC57b1/6マウスに、化合物または対照DMSOのいずれかを3日間毎日腹腔内注射した。4日目に、マウスに60mg/kgのPHZを腹腔内注射した。次いで、マウスに化合物または対照DMSOのいずれかをさらに2日間毎日腹腔内注射した。マウスの脾臓を解剖して、単一細胞懸濁液となるようにホモジナイズした。赤血球は、細胞懸濁液を塩化アンモニウム溶液により氷上で5分間インキュベートすることにより溶解した。次いで、脾臓細胞をいずれもメチルセルロース培地MethoCult SF M3436中に置き、9日後にBFU-Eコロニーを計数するか、またはTer119-APC抗体で染色した後にフローサイトメトリー解析を行った。

【0115】

条件的ノックインCre-Mx1 Srsf2 P95H/WT MDSマウスモデルおよび老化マウスモデル

【0116】

MDSマウスモデルでは、これまでに記載されているように（Kim et al., Cancer Cell 27, 617-630 (2015)）、Mx1-cre Srsf2 fl/WTおよびMx1-Cre Srsf2 P95H/WTマウスの新たに解剖した大腿骨および脛骨から骨髓細胞を回収した。Mx1-cre Srsf2 fl/WTまたはMx1-Cre Srsf2 P95H/WTのいずれかのマウス由来の骨髓細胞 1×10^6 個を、致死的に放射線を照射した（450cGyを2回）CD45.1レシピエントマウスに尾静脈注射により移植した。移植から3週間後、ポリI：ポリC（pIpC）を注射してMx1-cre発現を誘導した。MDS疾患表現型の確認後、マウスに化合物または対照DMSOのいずれかを45日間毎日腹腔内注射した。末梢血試料を後眼窩から採取して、Hemavet 950を使用するCBCを行った。

【0117】

老化マウスモデルでは、6～8週齢または18～21か月齢のC57b1/6マウスに対してCBCを実施した。18～21か月齢のマウスに、化合物または対照DMSOのいずれかを毎日腹腔内注射した。7日目に血液試料を採取してCBCを行った。

【0118】

RNAシーケンシング

【0119】

RNA単離では、SCF（100ng/ml-1）、EPO（2U/ml-1）、IGF-1（40ng/ml-1）およびデキサメタゾン（1nM）を含むSFEM I I中37℃で、オキシフェノニウム（100μM）またはDMSO対照のいずれかとともにBFU-Eを培養した。3日目に細胞を採取し、RNeasy（登録商標）ミニキット（Qiagen社）を使用してRNAを単離した。RNA-Seq試料調製キットv2（Illumina社）を使用してシーケンシングライブラリーを生成し、HiSeq（登録商標）2500プラットフォーム（Illumina社）によりシーケンシングした。STAR mapperを使用して、バックシーケンスリードをマウスゲノムにマッピングした（GRCh38、mm10）。リードは、これらのアダプターに従って逆多重化し、マッピング後の種々の解析に使用した。

【0120】

10

20

30

40

50

クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-Seq)

【0121】

ChIP-IT High Sensitivityキット (Active Motif社) を使用してChIP-Seqを実施した。E14.5のマウス胎仔肝臓からBFUE 5×10^6 個を単離した。SCF (100 ng ml^{-1})、EPO (2 U ml^{-1}) およびIGF-1 (40 ng ml^{-1}) を含むStemSpan SFEM II培地中 37°C でBFUEを培養した。細胞をオキシフェノニウム ($100 \mu\text{M}$) で45分間処理した。処理後、細胞を1%のホルムアルデヒド溶液を用いて15分間室温で穏やかに振盪させることにより架橋させた。架橋は、新たに調製した2.5Mのグリシン溶液を5分間室温で使用してクエンチした。核溶解緩衝液を使用して細胞を溶解し、Bioruptor (登録商標) 2000 (Diagenode社) を使用してON30秒およびOFF30秒による 3×10 分サイクルで30分間超音波処理した。少量の試料を採取し ($30 \mu\text{l}$)、プロテイナーゼKおよびRNase Aを使用して逆架橋させ、2%のアガロースゲル上で実行して超音波処理断片サイズを確認した。次いで、超音波処理DNAを、IgG対照 ($10 \mu\text{g}$ 、EMD Millipore社、17-600) またはCREB抗体 ($10 \mu\text{g}$ 、EMD Millipore社、17-600) のいずれかとともにチューブローター上に 4°C で一晩置いた。DNA溶液は、アガロースGビーズにより 4°C で4時間インキュベートし、DNA溶出および精製カラム (Active Motif社) を使用して、免疫沈降DNAの溶出および精製を実施した。

【0122】

TruSeq (登録商標) ChIP-Seq 試料調製キット (Illumina社) を使用してシーケンシングライブラリーを生成した。簡潔には、末端修復後、アダプターをライゲーションし、Size-select 2%アガロースゲル電気泳動系 (Invitrogen社) を使用して250~300bpのDNA断片を採取することにより、アダプターを有するDNA試料を精製した。精製したDNAライブラリーは、PCR増幅キット (Illumina社) を使用して18サイクルについて増幅し、AMPure XP 磁気ビーズ (Beckman Coulter社) を使用して精製した。シーケンシングライブラリーのサイズは、Bioanalyzer (商標) 2100 (Agilent社) の高感度DNAチップを使用して検証した。シーケンスリードを、Bowtie2を使用してマウスゲノムにアラインメントし (GRCm38, mm10)、これらのアダプター配列に従って逆多重化した。MACSプラットフォームを使用してピーク抽出を行った。これまでに記載されているように (Wang et al., Nat Protoc 8, 2502-2515 (2013))、結合および発現標的解析 (BETA) を実施した。

【0123】

RT-PCR

【0124】

RT-PCRでは、SuperScript逆転写酵素III (Invitrogen社) を使用して逆転写を実施した。PCRは、SYBR (登録商標) Green PCR マスターミックス (Life Technologies社) および7900HT (商標) リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems社) を使用して実施した。プライマー配列は、Gapdh、フォワードプライマー、CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA (配列番号1)、リバースプライマー、GCGGCACGTCA GATCCA (配列番号2)；Chrm4、フォワードプライマー、ATGGCGAAC TTCACACCTGTC (配列番号3)、リバースプライマー、CTGTCTGCAAT GAACACCATCT (配列番号4)；C-Kit、フォワードプライマー、GGCCTCACGAGTTCTATTTACG (配列番号5)、リバースプライマー、GGGGAGAGATTTCCCATCACAC (配列番号6)；Zfp36l2、フォワードプライマー、AGCGGCTCCAGATCAACT (配列番号7)、リバースプライマー、CGAAAGCGAAGGCGTTGTTA (配列番号8) である。

【0125】

免疫蛍光

【0126】

新たに単離したBFUEを1時間血清飢餓培養し、DMSOまたは100 μ Mのオキシフェノニウムのいずれかで45から60分間処理した。サイトスピンを使用して、ポリ-L-リジンをコーティングしたスライド上に細胞10⁴個を採取した。2%のパラホルムアルデヒドにより15分間、細胞を固定した後、0.1%のTriton X-100を使用して15分間透過処理し、2%のBSA溶液で30分間ブロッキングした。2%のBSA中のリン酸化CREB抗体（リン酸化S133、Abcam社、ab32096、1:250）により1時間細胞をインキュベートし、次いで、2%のBSA溶液中のFITCコンジュゲートヤギ抗マウス2次抗体（Abcam社、ab97022、1:500）およびFITCコンジュゲートヤギ抗ウサギ2次抗体（Abcam社、ab97050、1:500）により30分間インキュベートした。次いで、DAPIにより5分間細胞をインキュベートし、次いで、封入溶液により封入した。

10

【0127】

プラスミド

【0128】

次のオリゴをアニーリングし、BbsIで消化したMSCV-IRES-GFPベクターにクローニングした：Chrm4 shRNA1、aaaaTCTGATGAAGCCGACATTAAgtcgacTTAATGCTCGGCTTCATCAGA（配列番号9）；Chrm4 shRNA2、aaaaCCATCTTGTCTGTCAGTTTGgtcgacCAAAC TGCCAGAACAAAGATGG（配列番号10）。

20

【0129】

（実施例2）

この実施例では、他の低分子M4アンタゴニスト、例えば、PCS1055およびPD102807により、BFUE自己複製が促進され、*in vivo*において貧血が矯正されるかどうかを検討するために行った実験を記載する。

【0130】

結果

【0131】

図4Aは、PD102807の化学構造を示す。PD102807は、細胞培養下のBFUE細胞の増殖を増加させることが見出された（図4B）。加えて、PD102807はまた、マウスに投与した場合（PD102807では*i.p.* または経口）、HCTおよびRBCのレベルを上昇させることが見出された（それぞれ図4Cおよび4D）。図4Eは、放射性リガンド、および受容体を有する細胞膜を用いた標準的結合アッセイにおいて、 1×10^{-9} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-6} Mおよび 1×10^{-5} Mの濃度のPD102807を試験した結果を示す。

30

【0132】

材料および方法

【0133】

マウスBFUE培養系

【0134】

蛍光活性化細胞分類（FACS）法を使用してBFUEを胎生期14.5日のマウス胎仔肝臓から単離した。rmSCF（100 ng/ml）、EPO（2 U/ml）、rmIGF-1（40 ng/ml）、デキサメタゾン（1 nM）を含むStemSpan SFEM II培地中で、DMSO、PCS1055（5 nM）またはPD102807（3 nM）のいずれかとともにBFUEを培養した。形成された細胞数を*in vitro*での培養下で計数した。

40

【0135】

貧血マウスモデル

【0136】

50

動物実験をCold Spring Harbor LaboratoryのAnimal Shared Resourceにおいて、Institutional Animal Care and Use Committeeにより認可された手順に従って行った。Jackson Laboratoryから購入し、化合物および対照処置群にランダムに割り振った4～6週齢のC57BL/6マウスに、PCS1055 (50 mg/kg または100 mg/kg) を1日2回、またはPD102807 (50 mg/kg または100 mg/kg) を1日1回、3日間毎日経口送達した。3日目に、マウスに60 mg/kgのPHZを腹腔内注射した。次いで、マウスにPD102807 (50 mg/kg または100 mg/kg) を1日1回、2日間毎日経口送達した。6日目に、末梢血試料を後眼窩からヘパリン処理毛細管チューブを使用してK2-EDTAを有する血液採取チューブ内に採取した。Hemavet 950を使用してCBCを実施した。

10

【0137】

M4アンタゴニスト化合物の合成および解析

【0138】

化合物A～Kと名付けた一連のM4アンタゴニスト化合物を合成および解析した。このような化合物の構造を図5に示す。

【0139】

化合物A～Kの合成

【0140】

他に言及しない限り、すべての出発物質は、さらには精製せずに供給元からそのまま使用した。すべての反応は、炉乾燥したガラス器具においてシリンジおよびセプタムによる技術を使用して行い、NMRスペクトルは、500または600 MHzの装置で採取した。化学シフトは、重水素化溶媒ピークまたは(δ 0.00)における内部標準のテトラメチルシラン(TMS)ピークに対して記録し、百万分率(ppm)により報告する。選択された核の指定は、 ^1H COSYにより決定した。最終化合物の純度は、HPLC解析により判定した。薄層クロマトグラフィー(TLC)は、シリカゲルを0.25 mm厚でコーティングしたアルミニウム板上で行った。TLCプレートは、短および長波長のUV光下で観察するか、またはヨウ素染色後に観察するか、またはモリブデン(VI)酸アンモニウム四水和物および硫酸セリウム(IV)四水和物の溶液への曝露時にプレートを加熱することにより可視化した。フラッシュカラムクロマトグラフィー(FCC)は、シリカゲル60 (230～400メッシュ)を使用して実行し、TLC移動度と相関する段階的溶媒極性勾配を利用した。

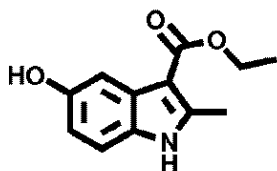
20

30

【0141】

5-ヒドロキシ-2-メチルインドール-3-カルボン酸エチル(インドール1)

【化31】



40

【0142】

氷酢酸450 mL中1, 4-ベンゾキノン(27 g、0.25モル)の溶液に3-アミノクロトン酸エチル(16.2 g、0.125モル)を少量ずつ、氷水浴を使用して反応温度を45℃未満に調節することにより加えた。反応混合物を室温で5時間攪拌した。沈殿した固体を酢酸および水で洗浄して灰色の結晶性固体17 g(62%)を得、酢酸でさらに洗浄して55%の収率で白色の固体を得た。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 11.51 (s, 1H), 8.82 (s, 1H), 7.31 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.52 Hz, 1H), 6.60 (dd, J = 2.4, 8.6 Hz, 1H), 4.24 (q, J = 7.08 Hz,

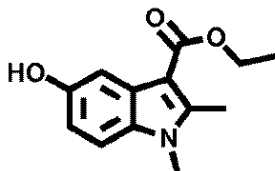
50

2H), 2.59 (s, 3H), 1.33 (t, $J = 7.08$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d_6) δ 165.2, 152.2, 144.4, 128.9, 127.9, 111.4, 111.2, 105.2, 102.1, 58.4, 14.5, 13.8.

【0143】

5-ヒドロキシ-1,2-ジメチル-1H-インドール-3-カルボン酸エチル（インドール2）

【化32】



10

【0144】

無水DCM（100 mL）中インドール1（3.0 g、13.76 mmol）の溶液にイミダゾール（2.0 g、28.9 mmol）およびTBSPS（3.7 mL、14.45 mmol）を加えた。反応混合物をRTで16時間攪拌した。TLCによる出発物質の消失後、反応混合物を5%のHCl溶液で処理した。有機相をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて灰色の固体を得、これを次のステップにおいて、さらには精製せずにそのまま使用した。

20

【0145】

無水DMF（10 mL）中の上記のシリル化誘導体（3.2 g、7.0 mmol）の溶液にNaH（油中分散60%）（440 mg、10.5 mmol）およびMeI（0.7 mL、10.5 mmol）を加えた。反応混合物を0℃で攪拌し、室温（RT）まで1時間、徐々に温めて、TLCにより出発物質を完全に消費させた。次いで、反応混合物を氷冷水で処理してEtOAc（25 mL×4）で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗製物質を得、これを精製せずに次のステップに移した。

【0146】

30

無水THF（20 mL）中の上記で調製したメチル化誘導体（3.0 g、6.4 mmol）の溶液に、1MのTBAF（9.5 mL、9.55 mmol）溶液を加えた。反応混合物をRTで2時間または出発物質が消失するまで攪拌した。反応混合物を5%のHCl溶液と混合して水層をEtOAc（25 mL×3）で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させた。粗製物質は、フラッシュクロマトグラフィーを使用して精製し、3回のステップにわたって55%の収率で白色の固体を得た。 ^1H NMR（600 MHz, アセトン d_6 ） δ 7.87 (s, 1H), 7.56 (d, $J = 2.28$ Hz, 1H), 7.24 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H), 6.76 (dd, $J = 2.46, 8.7$ Hz, 1H), 4.30 (q, $J = 7.14$ Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.72 (s, 3H), 1.38 (t, $J = 7.14$ Hz, 3H); ^{13}C NMR（150 MHz, アセトン d_6 ） δ 166.3, 153.8, 146.2, 132.4, 128.7, 112.2, 112.1, 110.8, 107.0, 106.9, 103.7, 59.5, 15.1, 12.0.

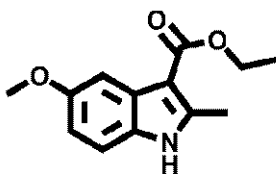
40

【0147】

5-メトキシ-2-メチル-1H-インドール-3-カルボン酸エチル（インドール3）

50

【化 3 3】



【0148】

無水DCM (100 mL) 中インドール1 (3.0 g、13.76 mmol) の溶液にイミダゾール (2.0 g、28.9 mmol) およびTBSPS (3.7 mL、14.45 mmol) を加えた。TLCによる出発物質の消失後、反応混合物をRTで16時間攪拌した。次いで、反応混合物を5%のHCl溶液で処理した。有機相をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて灰色の固体を得、これを次のステップにおいて、さらには精製せずにそのまま使用した。

【0149】

無水THF (60 mL) 中の上記のシリル化インドール (3.1 g、6.8 mmol) の溶液に二炭酸ジ-tert-ブチル (3.0 g、13.6 mmol) およびDMAP (85 mg、0.68 mmol) を加え、反応混合物を1時間、連続的に攪拌することにより50℃まで加熱した。次いで、反応混合物を水と混合し、EtOAc (25 mL×3) で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させた。EtOAc／ヘキサンを使用するフラッシュクロマトグラフィー後、N-Boc保護インドールを白色の固体として採取した (3.22 g、85%)。

【0150】

無水THF (15 mL) 中の上記で調製したN-boc保護インドール (3.0 g、5.4 mmol) の溶液に1MのTBFA溶液 (8.1 mL、8.1 mmol) を加えた。反応混合物をRTで2時間または出発物質が消失するまで攪拌した。反応混合物を5%のHCl溶液と混合して水層をEtOAc (25 mL×3) で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させた。粗製物質は、フラッシュクロマトグラフィーを使用して精製し、白色の固体を得た (1.45 g、収率84.2%)。

【0151】

無水DMF (10 mL) 中の上記の5-ヒドロキシインドール誘導体 (1.0 g、3.1 mmol) の溶液にNaH (油中分散60%) (190 mg、4.7 mmol) およびMeI (0.3 mL、4.7 mmol) を加えた。反応混合物を0℃で攪拌し、RTまで1時間にわたって徐々に温めて、TLCにより出発物質を完全に消費させた。次いで、反応混合物を氷冷水で処理してEtOAc (25 mL×4) で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗製物質を得、これを、EtOAc／ヘキサンを使用するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して (922 mg、収率89%) を得た。

【0152】

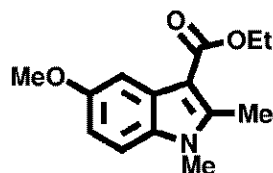
上記で調製した5-メトキシインドール誘導体 (900 mg、2.8 mmol) をジオキサン (8 mL) 中4MのHCl溶液で処理し、100℃まで2時間加熱した。真空下での揮発物の蒸発後、粗製物質を、EtOAc／ヘキサンを使用するフラッシュクロマトグラフィー精製に供して、白色の固体 (340 mg、52%) を、または5回のステップにわたって30%の収率で得た。¹H NMR (600 MHz, アセトンd₆) δ 10.61 (bs, 1H), 7.60 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.25 (d, J = 8.4, 1H), 6.77 (dd, J = 2.5, 8.7 Hz, 1H), 4.33 (q, J = 7.14 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 1.40 (t, J = 7.08 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, アセトンd₆) δ 166.3, 156.4, 145.4, 131.0, 129.3, 112.4, 112.3, 104.7, 104.2, 59.6, 5

5.8, 15.0, 14.3.

【0153】

5-メトキシ-1,2-ジメチル-1H-インドール-3-カルボン酸エチル（インドール4）

【化34】



10

【0154】

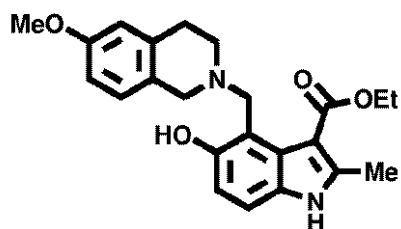
無水DMF（10 mL）中インドール1（440 mg、2.0 mmol）の溶液にNaH（油中分散60%）（160 mg、4.0 mmol）およびMeI（570 μ L、10 mmol）を加えた。反応混合物を0℃で攪拌し、RTまで30分間徐々に温めて、TLCによる出発物質の完全な消費を観察した。次いで、反応混合物を氷冷水で処理してEtOAc（25 mL $\times$ 4）で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗製物質を得、これを、FCCおよびEtOAc／ヘキサンを使用して精製し、380 mg、77%のメチル化インドール4を得た。¹H NMR（600 MHz, アセトンd₆） δ 7.62 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 7.30 (d, J = 8.8, 1H), 6.82 (dd, J = 2.6, 8.9 Hz, 1H), 4.32 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.72 (s, 3H), 1.41 (t, J = 7.14 Hz, 3H); ¹³C NMR（150 MHz, アセトンd₆） δ 166.3, 156.6, 146.3, 132.7, 128.5, 112.0, 111.0, 104.5, 104.1, 59.6, 55.8, 15.0, 12.1.

20

【0155】

5-ヒドロキシ-4-（（6-メトキシ-3,4-ジヒドロイソキノリン-2（1H）-イル）メチル）-2-メチル-1H-インドール-3-カルボン酸エチル（インドール誘導体5）

【化35】



30

【0156】

氷酢酸／水5：1の溶液（250 μ L）中インドール1（30 mg、0.135 mmol）の溶液に6-メトキシテトラヒドロイソキノリン（20 mg、0.12 mmol）およびホルマリン37%溶液（12 μ L、0.12 mmol）を加えた。反応混合物を90℃で30分間攪拌して、TLCによる出発物質の完全な消費を観察し、次いで、反応混合物を真空下で蒸発させて酢酸を除去した。生じた粗製物質をEtOAc（5 mL）に溶解し、有機層を飽和NaHCO₃およびブラインで洗浄した。有機層は、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、蒸発させて、生じた粗製物を80%のEtOAc／ヘキサンを使用するFCCに供して、（27 mg、58%）の表題の化合物を得た。¹H NMR（600 MHz, CDCl₃） δ 8.27 (bs, 1H), 7.09 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.90 (d, J = 8.5, 1H), 6.76 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 6.68 (dd, J = 2.6, 8.4 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 2.6 Hz, 1H), 4.45 (s, 2H), 4.33 (q, J = 4.3 Hz, 2H), 3.75 (

40

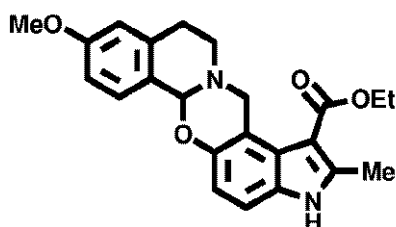
50

m, 5H), 2.91 (bs, 3H), 2.59 (s, 3H), 1.38 (t, $J = 7.14$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 166.6, 158.4, 154.7, 143.0, 135.1, 129.5, 127.8, 126.2, 126.1, 113.7, 113.4, 112.5, 111.8, 110.7, 105.7, 60.1, 58.2, 55.5, 54.9, 50.1, 29.9, 29.5, 15.4, 14.8, 14.3.

【0157】

9-メトキシ-2-メチル-3, 6a, 11, 14-テトラヒドロ-12H-インドロ[4', 5':5, 6][1, 3]オキサジノ[2, 3-a]イソキノリン-1-カルボン酸エチル (誘導体6)

【化36】



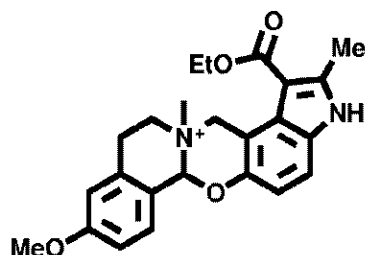
【0158】

無水EtOH (12.0 mL) 中のインドール誘導体5 (2.2 g、5.6 mmol) の溶液に、EtOH 2.0 mL に溶解した酢酸カリウム (602 mg、6.14 mmol) およびヨウ素 (1.42 g、5.6 mmol) を加えた。ヨウ素液を滴下により還流温度で加えた。添加が完了すると、反応混合物を同一温度でさらに30分間攪拌し、ヨウ素の色が消失するまで飽和チオ硫酸ナトリウム溶液で処理することにより反応をクエンチした。次いで、反応混合物を5%のMeOH/EtOAc (25 mL $\times$ 4) で抽出した。有機層を飽和NaHCO₃およびブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、蒸発させて、生じた粗製物を5%のMeOH/EtOAcを使用するFCCに供して、1.45 g (6%) の表題の化合物を得た。 ^1H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 11.63 (s, 1H), 7.30 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 7.10 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.82 (dd, $J = 2.6, 8.5$, 1H), 6.76 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 5.64 (s, 1H), 4.70 (d, $J = 17.6$ Hz, 1H), 4.24 (m, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.32 (m, 5H), 3.08-2.93 (m, 2H), 2.80-2.72 (m, 2H), 2.55 (s, 3H), 1.33 (t, $J = 7.14$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165.0, 159.1, 148.4, 143.4, 136.3, 129.6, 129.3, 126.3, 123.9, 112.7, 112.1, 112.0, 110.4, 110.1, 104.1, 85.0, 58.9, 55.0, 53.5, 43.6, 28.7, 14.4.

【0159】

化合物AおよびB: 1-(エトキシカルボニル)-9-メトキシ-2, 13-ジメチル-3, 6a, 11, 12, 13, 14-ヘキサヒドロインドロ[4', 5':5, 6][1, 3]オキサジノ[2, 3-a]イソキノリン-13-イウムヨウ化物

【化37】



【0160】

工業グレードのアセトン (10 mL) 中インドロ-オキサジノイソキノリン誘導体6 (

580 mg、1.48 mmol) の溶液に MeI (420 μ L、7.4 mmol) を加え、反応混合物を RT で 16 時間攪拌した。次いで、有機溶媒を真空下で完全に蒸発させ、粗製物質を 15% の DMF および 85% の CHCl₃ を使用する FCC に供して、2 つのジアステレオマー (A および B) を 2 : 1 の比率で得た (全収率 85% 中、極性のより低い物質は 260 mg および極性のより高い物質は 409 mg)。¹H NMR 極性のより低い誘導体について記載 (化合物 A) (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.16 (s, 1H), 7.64 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.47 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.13 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 2.5, 8.7 Hz, 1H), 6.99 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.51 (s, 1H), 5.28 (q, J = 16.3 Hz, 1H), 4.29-4.27 (m, 2H), 4.19 (dd, J = 6.0, 12.5 Hz, 1H), 4.04 (dt, J = 5.2, 12.8 Hz, 1H), 3.83 (s, 1H), 3.40-3.37 (m, 1H), 3.21 (dd, J = 5.3, 19.0 Hz, 1H), 2.87 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 1.39 (t, J = 7.14 Hz, 3H); ¹³C NMR 極性のより低いものについて記載 (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164.7, 160.1, 145.5, 145.2, 133.0, 131.5, 127.7, 123.2, 118.9, 114.1, 113.2, 112.9, 112.3, 105.7, 104.2, 89.4, 62.9, 59.6, 57.4, 55.4, 37.9, 23.0, 14.7, 14.3.

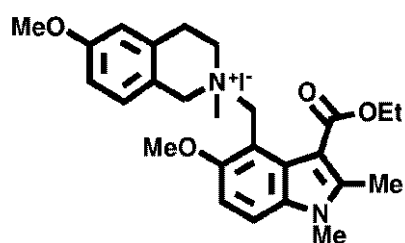
【0161】

¹H NMR 極性誘導体について記載 化合物 B (600 MHz, DMSO-d₆) δ 12.10 (s, 1H), 7.43 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.99-6.94 (m, 3H), 6.42 (s, 1H), 5.24 (q, J = 16.9 Hz, 1H), 4.30 (m, 2H), 3.90 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.32 (m, 2H), 3.23 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 1.36 (t, J = 7.14 Hz, 3H); ¹³C NMR 極性誘導体について記載 (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164.7, 160.8, 145.3, 143.1, 133.0, 131.3, 129.6, 122.7, 119.4, 113.8, 113.5, 112.9, 112.2, 104.9, 104.1, 87.7, 59.6, 55.4, 51.8, 47.6, 45.7, 23.0, 14.6, 14.3.

【0162】

化合物 G : 2 - ((3 - (エトキシカルボニル) - 5 - メトキシ - 1, 2 - ジメチル - 1 H - インドール - 4 - イル) メチル) - 6 - メトキシ - 2 - メチル - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 2 - イウムヨウ化物

【化38】



【0163】

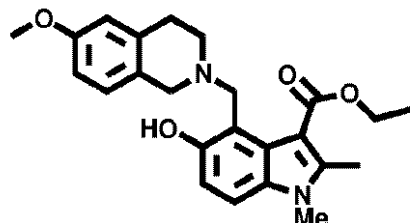
無水 DMF (5.0 mL) 中インドール誘導体 5 (394 mg、1.0 mmol) の溶液に NaH (油中分散 60%) (120 mg、3.0 mmol) および MeI (200 μ L、3.0 mmol) を加えた。反応混合物を 0°C で攪拌し、RT まで 30 分間徐々に温めて、TLC による出発物質の完全な消費を観察した。次いで、反応混合物を氷冷水で処理して EtOAc (25 mL $\times$ 4) で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗製物質を得、これを、FCC および 20% MeOH / 1% Et₃N / DCM 溶液を使用して精製し、336.5 mg、60% のメチル化インドール 8 を得た。¹H NMR (600 MHz, アセトン-d₆) δ 7.79 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.24 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.15 (d, J = 9.3 Hz, 1H), 6.91 (m, 2H), 4.65 (ABq, J = 14.9 Hz, δ = 0.17, 2H), 4.13 (m, 2H), 3.94 (m, 4H), 3.87 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.34 (m, 2H), 3.04 (s, 3H), 2.81 (s, 2H), 2.78 (s, 3H), 1.41 (t, J = 7.14 Hz, 1H); ¹³C NMR (150

MHz, アセトン d_6) δ 167.6, 160.7, 156.9, 149.1, 134.0, 132.1, 129.6, 129.5, 120.5, 114.9, 114.7, 114.0, 108.6, 107.6, 105.5, 62.3, 61.3, 59.1, 57.2, 55.8, 30.9, 25.1, 14.8, 14.0.

【0164】

化合物D：5-ヒドロキシ-4-((6-メトキシ-3,4-ジヒドロイソキノリン-2(1H)-イル)メチル)-1,2-ジメチル-1H-インドール-3-カルボン酸エチル

【化39】



10

【0165】

氷酢酸／水5：1の溶液(11 mL)中インドール誘導体2(2.1 g、9.0 mmol)の溶液に6-メトキシテトラヒドロイソキノリン(1.83 g、9.23 mmol)およびホルマリン37%溶液(766 μ L、9.45 mmol)を加えた。反応混合物を90℃で30分間攪拌して、TLCによる出発物質の完全な消費を観察した。次いで、反応混合物を真空中で蒸発させて酢酸を除去した。生じた粗製物質をEtOAc(5 mL)に溶解し、有機層を飽和NaHCO₃およびブラインで洗浄した。有機層は、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、蒸発させて、生じた粗製物を80%のEtOAc／ヘキサンを使用するFCCに供して、2.2 g(63%)の表題の化合物を得た。¹H NMR(600 MHz, アセトン d_6) δ 11.34 (bs, 1H), 7.21 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.71-6.68 (m, 3H), 4.34 (s, 2H), 4.30 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H), 5.70 (m, 5H), 2.90-2.84 (m, 5H), 2.60 (s, 3H), 1.36 (t, J = 7.14 Hz, 3H); ¹³C NMR(150 MHz, アセトン d_6) δ 167.0, 159.3, 155.2, 144.1, 135.8, 132.4, 128.4, 127.0, 126.1, 113.9, 113.4, 113.2, 112.0, 110.1, 105.6, 60.2, 58.8, 55.5, 55.4, 50.8, 15.0, 12.3.

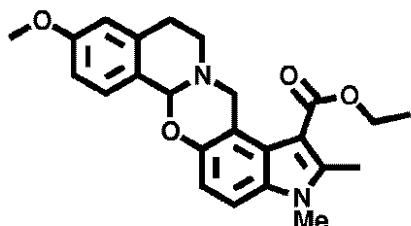
20

30

【0166】

化合物C：9-メトキシ-2,3-ジメチル-3,6a,11,14-テトラヒドロ-12H-インドロ[4',5':5,6][1,3]オキサジノ[2,3-a]イソキノリン-1-カルボン酸エチル

【化40】



40

【0167】

無水EtOH中の化合物Dの溶液に、EtOH 2.0 mLに溶解した酢酸カリウムおよびヨウ素を加えた。ヨウ素液を滴下により還流温度で加えた。添加が完了すると、反応混合物を同一温度でさらに30分間攪拌し、ヨウ素の色が消失するまで飽和チオ硫酸ナトリウム溶液で処理することにより反応をクエンチし、次いで、反応混合物を5%のMeOH

50

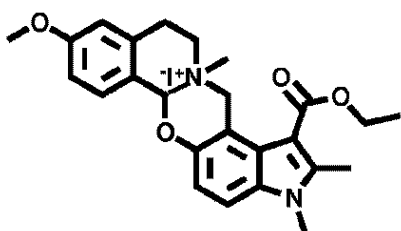
／EtOAc (5 mL×4) で抽出した。有機層を飽和NaHCO₃およびブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。生じた粗製物を5%のMeOH／EtOAcを使用するFCCに供して、表題の化合物を得た。¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ 7.31 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 6.82 (dd, J = 2.6, 8.4, 1H), 6.75 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 6.62 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 5.68 (s, 1H), 4.40 (ABq, J = 17.5 Hz, δ = 0.52, 2H), 4.27 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.03 (m, 1H), 2.95 (m, 1H), 2.79-2.70 (m, 2H), 2.60 (s, 3H), 1.33 (t, J = 7.14 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ 165.2, 159.1, 148.7, 143.8, 136.3, 131.2, 129.4, 126.2, 123.1, 112.8, 112.0, 109.9, 109.3, 104.1, 85.1, 59.3, 55.1, 53.4, 43.5, 29.8, 28.7, 14.4, 12.1.

10

【0168】

化合物HおよびI：1-(エトキシカルボニル)-9-メトキシ-2,3,13-トリメチル-3,6a,11,12,13,14-ヘキサヒドロインドロ[4',5':5,6][1,3]オキサジノ[2,3-a]イソキノリン-13-イウムヨウ化物

【化41】



20

【0169】

工業グレードのアセトン中の化合物Cの溶液にMeIを加え、反応混合物をRTで16時間攪拌した。次いで、有機溶媒を真空下で完全に蒸発させ、粗製物質を15%のDMFおよび85%のCHCl₃を使用するFCCに供して、2つのジアステレオマーを2:1の比率で得た。¹H NMR 極性のより低い誘導体について記載 (化合物H) (600 MHz, DMSO-d₆) δ 7.68 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 6.7 Hz, 1H), 7.20 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.07 (dd, J = 2.5, 8.6 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 6.53 (s, 1H), 5.23 (ABq, J = 16.1 Hz, Δδ = 0.13, 2H), 4.39-4.27 (m, 2H), 4.16 (dd, J = 5.9, 12.5 Hz, 1H), 4.03 (dt, J = 5.0, 12.7 Hz, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.41-3.32 (m, 1H), 3.20 (dd, J = 5.2, 18.4 Hz, 1H), 2.89 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 1.39 (t, J = 7.14 Hz, 3H); ¹³C NMR 極性のより低いものについて記載 (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164.7, 160.2, 146.0, 145.5, 133.1, 133.0, 127.8, 122.4, 118.9, 114.2, 113.2, 112.2, 111.9, 105.6, 104.1, 89.4, 62.8, 59.9, 57.5, 55.5, 37.9, 30.3, 23.0, 14.4, 12.4.

30

【0170】

¹H NMR 極性誘導体について記載 (化合物I) (600 MHz, DMSO-d₆) δ 7.60 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 8.6 Hz, 1H), 7.01 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 6.98 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 6.95 (dd, J = 2.6, 8.5 Hz, 1H), 6.44 (s, 1H), 5.19 (q, J = 16.8 Hz, 1H), 4.36-4.27 (m, 2H), 3.86 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.74 (s, 3H), 3.33 (m, 2H), 3.22 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 1.36 (t, J = 7.14 Hz, 3H); ¹³C NMR 極性誘導体について記載 (150 MHz, DMSO-d₆) δ 164.7, 160.8, 145.8, 143.3, 133.0, 132.8, 129.7, 121.9, 119.4, 113.9, 113.6, 112.2, 111.9, 104.8, 104.0, 87.7, 59.8, 55.4, 47.6, 30.2, 23.1, 14.3, 12.3.

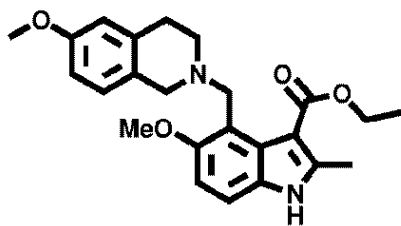
40

【0171】

50

化合物 E：5-メトキシ-4-((6-メトキシ-3,4-ジヒドロイソキノリン-2(1H)-イル)メチル)-2-メチル-1H-インドール-3-カルボン酸エチル (20180705-A688Y)

【化42】



10

【0172】

無水DCM (100 mL) 中インドール1 (3.0 g、13.76 mmol) の溶液にイミダゾール (2.0 g、28.9 mmol) およびTBSPS (3.7 mL、14.45 mmol) を加えた。反応混合物をRTで16時間攪拌した。TLCによる出発物質の消失後、反応混合物を5%のHCl溶液で処理した。有機相をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて灰色の固体を得、これを次のステップにおいて、さらには精製せずにそのまま使用した。

【0173】

無水THF (60 mL) 中の上記のシリル化インドール (3.1 g、6.8 mmol) の溶液に二炭酸ジ-tert-ブチル (3.0 g、13.6 mmol) およびDMAP (85 mg、0.68 mmol) を加えた。反応混合物を1時間、連続的に攪拌することにより50℃まで加熱した。次いで、反応混合物を水と混合し、EtOAc (25 mL×3) で抽出した。合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させた。EtOAc／ヘキサンを使用するフラッシュクロマトグラフィー後、N-Boc保護インドールを白色の固体として採取した (3.22 g、85%)。

20

【0174】

無水THF (15 mL) 中の上記で調製したN-Boc保護インドール (3.0 g、5.4 mmol) の溶液に1MのTBAF溶液 (8.1 mL、8.1 mmol) を加えた。反応混合物をRTで2時間または出発物質が消失するまで攪拌した。反応混合物を5%のHCl溶液と混合して水層をEtOAc (25 mL×3) で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させた。粗製物質は、フラッシュクロマトグラフィーを使用して精製し、白色の固体を得た (1.45 g、収率84.2%)。

30

【0175】

氷酢酸／水5：1の溶液 (1.33 mL) 中の前述のステップのインドール誘導体 (319.0 mg、1.0 mmol) の溶液に6-メトキシ-テトラヒドロイソキノリンHCl塩 (198 g、1.0 mmol) およびホルマリン37%溶液 (81 μL、1.0 mmol) を加えた。反応混合物を90℃で30分間攪拌して、TLCによる出発物質の完全な消費を観察した。次いで、反応混合物を真空下で蒸発させて酢酸を除去した。生じた粗製物質をEtOAc (5 mL) に溶解し、有機層を飽和NaHCO₃およびブラインで洗浄した。有機層は、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、蒸発させた。生じた粗製物を80%のEtOAc／ヘキサンを使用するFCCに供して、316 mg (64%) を得た。

40

【0176】

無水DMF (2.0 mL) 中の上記の生じた5-ヒドロキシインドール誘導体 (135 mg、0.27 mmol) の溶液にNaH (油中分散60%、11.0 mg、0.27 mmol) およびMeI (17.5 μL、0.27 mmol) を加えた。反応混合物を0℃で攪拌し、RTまで1時間にわたって徐々に温めて、TLCによる出発物質の完全な消費を観察した。次いで、反応混合物を氷冷水で処理してEtOAc (5 mL×4) で抽出し

50

、合わせた有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗製物質を得、これを、 EtOAc ／ヘキサンを使用するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して（98mg、収率71%）を得た。

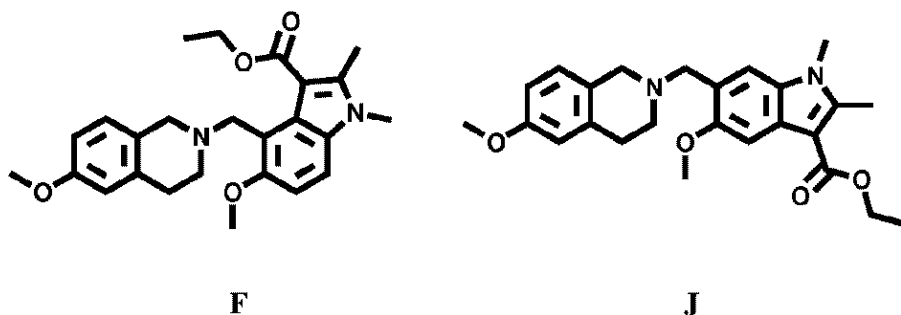
【0177】

上記で調製した5-メトキシインドール誘導体（80mg、0.16mmol）の溶液にジオキサン（4.0mL）中の4Mの HCl 溶液を加え、溶液を100℃まで2時間加熱した。真空下での揮発物の蒸発後、粗製物質を、 EtOAc ／ヘキサンを使用するフラッシュクロマトグラフィー精製に供して白色の固体（45mg、69.0%）を得た。 ^1H NMR（600 MHz, アセトン d_6 ） δ 7.23（d, J = 8.8 Hz, 1H）, 6.93（d, J = 8.8 Hz, 1H）, 6.82（d, J = 8.4 Hz, 1H）, 6.61（dd, J = 2.6, 8.8 Hz, 1H）, 6.57（d, J = 2.5 Hz, 1H）, 4.16（s, 2H）, 4.09（q, J = 7.1 Hz, 2H）, 3.83（s, 3H）, 3.70（s, 3H）, 3.39（s, 2H）, 2.82（s, 2H）, 2.63（t, J = 5.8 Hz, 2H）, 2.50（m, 5H）, 1.16（t, J = 7.1 Hz, 3H）; ^{13}C NMR 極性誘導体について記載（150 MHz, DMSO-d_6 ） δ 166.5, 158.8, 154.3, 137.0, 132.4, 129.0, 128.0, 127.6, 113.8, 112.5, 111.0, 109.8, 109.1, 60.1, 58.2, 55.7, 55.4, 52.4, 50.5, 30.7, 14.8, 13.8.

【0178】

化合物FおよびJ：

【化43】



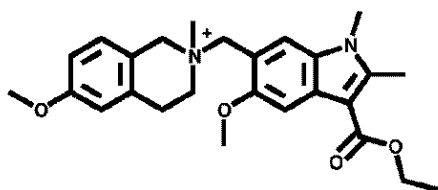
【0179】

無水DMF（1.0mL）中の上記の生じた5-ヒドロキシインドール誘導体（40.0mg、0.1mmol）の溶液に NaH （油中分散60%、4.0mg、0.1mmol）および MeI （14.0 μL 、0.1mmol）を加えた。反応混合物を0℃で攪拌し、RTまで1時間にわたって徐々に温めて、TLCによる出発物質の完全な消費を観察した。次いで、反応混合物を氷冷水で処理して EtOAc （2.0mL $\times$ 4）で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗製物質を得、これを、 EtOAc ／ヘキサンを使用するフラッシュクロマトグラフィーにより精製して19.0mg（収率37%）を得た。

【0180】

化合物K：

【化44】



【0181】

化合物を次のように合成した。化合物Jの溶液に NaH （油中分散60%、11.0m

g、0.27 mmol) および MeI (17.5 μ L、0.27 mmol) を加えた。反応混合物を 0℃で攪拌し、RTまで1時間にわたって徐々に温めて、TLCによる出発物質の完全な消費を観察した。次いで、反応混合物を氷冷水で処理して EtOAc で抽出し、合わせた有機層をブラインで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、真空下で蒸発させて粗製物質を得、これを、EtOAc/ヘキサンを使用するフラッシュクロマトグラフィーにより精製した。

【0182】

結合アッセイの結果

【0183】

図6は、PD102807および化合物A~Kの、受容体CHRM1~5 (M1~M5) に対する受容体結合アッセイの結果を示す。1×10⁻⁹ M、1×10⁻⁸ M、1×10⁻⁷ M、1×10⁻⁶ Mおよび1×10⁻⁵ Mの濃度のPD102807および化合物A~Kを、放射性リガンド、および受容体を有する細胞膜を用いた標準的結合アッセイにおいて試験した。化合物の結合は、各標的に特異的な放射活性標識リガンドの結合の阻害パーセントとして算出し、K_i値を決定した。K_i値は、以下の表1に提示する。CHRM1では、[³H] ピレンゼピン (2 nM) を放射性リガンドとして、およびヒト組換えCHRM1受容体を有するCHO細胞膜を使用して、結合アッセイを実施した。インキュベーション時間は、室温で60分であった。CHRM2では、[³H] AF-DX 384 (2 nM) を放射性リガンドとして、およびヒト組換えCHRM2受容体を有するCHO細胞膜を使用して、結合アッセイを実施した。インキュベーション時間は同様に、室温で60分であった。CHRM3では、[³H] 4-DAMP (0.2 nM) を放射性リガンドとして、およびヒト組換えCHRM3受容体を有するCHO細胞膜を使用して、結合アッセイを実施した。インキュベーション時間は同様に、室温で60分であった。CHRM4では、[³H] 4-DAMP (0.2 nM) を放射性リガンドとして、およびヒト組換えCHRM4受容体を有するCHO細胞膜を使用して、結合アッセイを実施した。インキュベーション時間は同様に、室温で60分であった。CHRM5では、[³H] 4-DAMP (0.3 nM) を放射性リガンドとして、およびヒト組換えCHRM5受容体を有するCHO細胞膜を使用して、結合アッセイを実施した。インキュベーション時間は同様に、室温で60分であった。

10

20

30

40

50

【表 1】

表1. 種々の化合物のKi値

	M4	M3	M1	M2	M5
A	1.8E-06	*	5.2E-06	2.2E-06	3.5E-06
B	4.3E-06	*	6.6E-06	*	*
C	4.6E-09	6.0E-07	5.2E-06	8.5E-07	*
D	4.2E-08	7.4E-07	2.8E-07	5.9E-08	*
E	1.5E-06	*	8.5E-06	2.6E-06	*
F	9.5E-07	3.9E-06	*	3.9E-06	*
G	1.5E-06	4.0E-07	4.4E-06	7.6E-07	*
I	7.4E-07	*	8.5E-06	1.7E-06	1.0E-05
J	8.9E-09	1.7E-06	1.3E-06	7.5E-07	*
K	5.4E-08	4.0E-07	5.4E-08	1.0E-07	9.8E-07
PD	5.1E-09	2.1E-07	*	2.5E-06	*

値はKi(M)である

* は非結合を表す

【0184】

図7および8は、初代BFU-E培養アッセイの結果を示す。図7は、化合物A、B、C、HおよびIの結果を示し、一方、図8は、化合物D、E、F、G、JおよびKの結果を示す。図7および8のデータは、PD102807および化合物A～KによりBFU-E増殖が誘導されることを実証する。高度に精製したBFU-Eは、lin-Ter-119-CD16/CD32-Scal-1-CD41-c-Kit+CD71/Cd24a10%low集団として、蛍光活性化細胞分類(FACS)法を使用して単離した。BFU-Eは、rmSCF、EPOおよびrmIGF-1を含む培地中、指示濃度のPD102807または化合物A～Kの存在下で培養した。培養系における9日目の細胞数を示すと、非処理よりも化合物A～Kで処理した培養物において細胞増殖倍率が有意に高かった。

【0185】

図9は、PD102807ならびに化合物AおよびBの薬物動態プロファイル(血漿)および脳浸透アッセイを示す。濃度(上パネル)および濃度比(血漿/脳)(下パネル)を図9に示す。図9のデータは、化合物AおよびBが、PD102807と比較して脳浸透の低下を示すことを実証する。PD102807ならびに化合物AおよびBは、マウスに腹腔内注射した。血液を各時点で採取し、これに移した抗凝固剤を含むチューブを遠心分離して血漿を得た。脳試料は、各時点で採取し、次いで、液体窒素中に急速冷凍して-75±15℃に維持した。脳試料をホモジナイズした。血漿および脳試料におけるPD102807ならびに化合物AおよびBの濃度は、LC-MS/MS法を使用して解析した。

【0186】

図10は、in vivoでの貧血動物モデル有効性アッセイにおける化合物の結果を示し、化合物AおよびBによりin vivoにおいて貧血が処置されることを実証する。C57bl/6マウスに60mg/kgのフェニルヒドラジンを注射して溶血を誘導した。マウスに媒体対照または化合物AもしくはB(30mg/kgまたは100mg/kg)のいずれかを送達した。末梢血試料を後眼窩からヘパリン処理毛細管チューブを使用してK2-EDTAを有する血液採取チューブ内に採取した。Hemavet 950を使用して全血球計算を実施した。ヘマトクリット(HCT)、赤血球(RBC)およびヘモグロビン(Hb)値を示す。

【0187】

図11は、*in vivo*での貧血動物モデル有効性アッセイにおける化合物の結果を示し、化合物BおよびIにより*in vivo*において貧血が処置されることを実証する。C57bl/6マウスに60mg/kgのフェニルヒドラジンを注射して溶血を誘導した。マウスに媒体対照または化合物B（1.5mg/kg、3mg/kgまたは5mg/kg）またはI（0.5mg/kg、0.7mg/kgまたは1mg/kg）のいずれかを皮下注射により送達した。末梢血試料を後眼窩からヘパリン処理毛細管チューブを使用してK2-EDTAを有する血液採取チューブ内に採取した。Hemavet 950を使用して全血球計算を実施した。ヘマトクリット（HCT）、赤血球（RBC）およびヘモグロビン（Hb）値を示す。

10

【0188】

図12は、化合物Gの薬物動態プロファイル（血漿）および脳浸透アッセイを示す。濃度（上パネル）および濃度比（血漿/脳）（下パネル）を図12に示す。図12のデータは、化合物Gが、PD102807と比較して脳浸透の低下を示すことを実証する。化合物Gは、マウスに腹腔内注射した。血液を各時点で採取し、これに移した抗凝固剤を含むチューブを遠心分離して血漿を得た。脳試料は、各時点で採取し、次いで、液体窒素中に急速冷凍して $-75 \pm 15^\circ\text{C}$ に維持した。脳試料をホモジナイズした。血漿および脳試料における化合物Gの濃度は、LC-MS/MS法を使用して解析した。

【0189】

本発明の好ましい実施形態であると現在考えられるものを示し、記載しているが、当業者は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲内に留まる種々の変更および改変を行い得る。

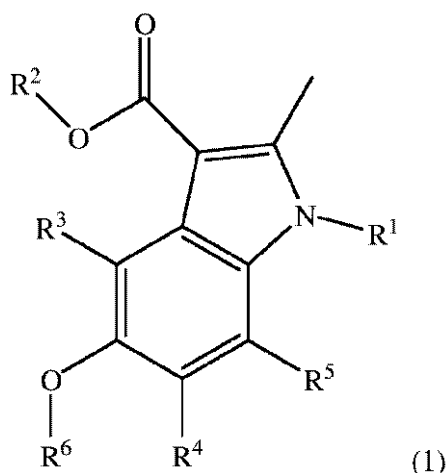
20

一実施形態において、例えば、以下の項目が提供される。

（項目1）

式：

【化45】



30

の化合物であって、式中、

R^1 が、Hまたは CH_3 であり、

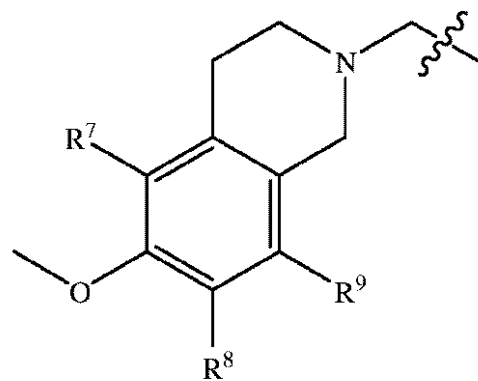
R^2 が、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、

R^3 、 R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH 、 SCH_3 および次の構造（1-1）：

40

50

【化 4 6】



(1-1)

10

から独立的选择されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つが、式（1-1）の構造であり、

R^6 が、Hまたは CH_3 であり、

R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的选择され、

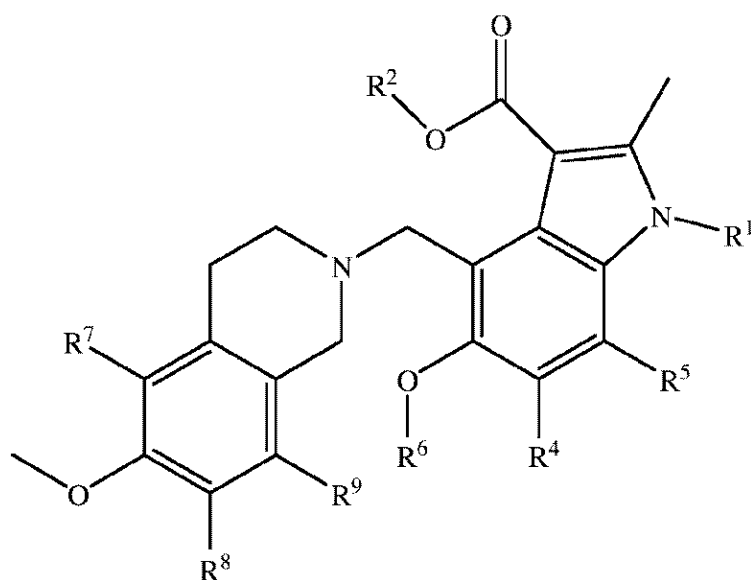
そして前記式（1）の化合物が、前記式（1）の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、化合物。

20

（項目2）

前記化合物が、次の式：

【化 4 7】



(1a)

30

を有する、項目1に記載の化合物。

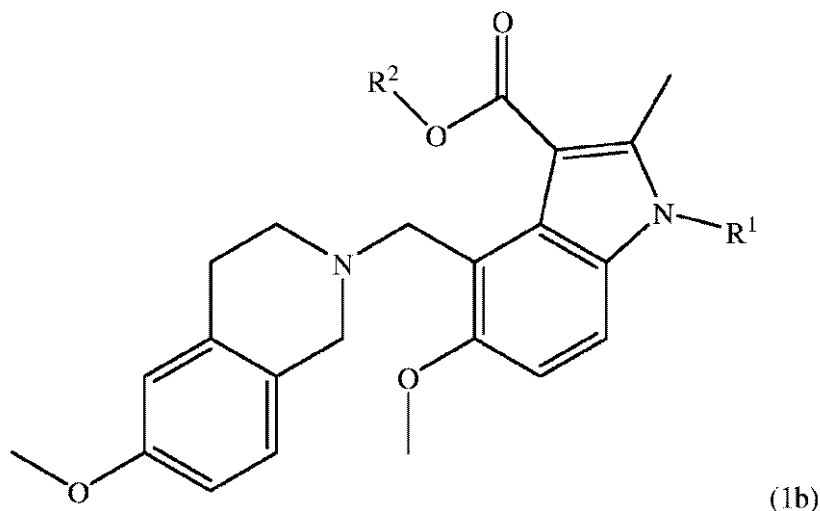
（項目3）

前記化合物が、次の式：

40

50

【化 4 8】



10

を有する、項目 1 に記載の化合物。

(項目 4)

R^1 が水素原子である、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 5)

R^1 がメチルである、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 6)

R^2 がエチルである、項目 1 から 5 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 7)

R^1 が水素原子であり、そして R^2 がエチルである、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

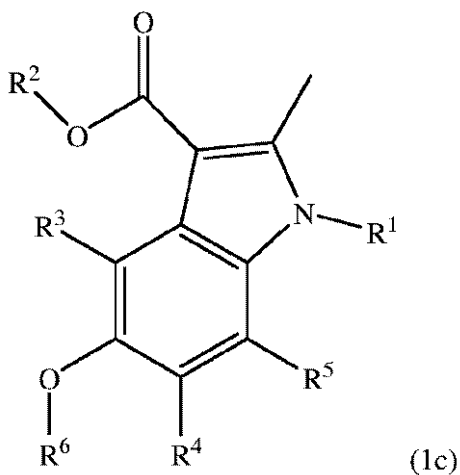
(項目 8)

R^1 がメチルであり、そして R^2 がエチルである、項目 1 から 3 のいずれか一項に記載の化合物。

(項目 9)

式：

【化 4 9】



40

の化合物であって、式中、

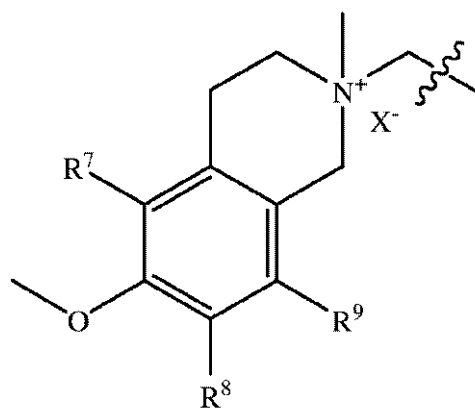
R^1 が、H または CH_3 であり、

R^2 が、炭素原子 1 ～ 3 個を有する炭化水素基であり、

50

R^3 、 R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH 、 SCH_3 および次の構造（1-2）：

【化50】



(1-2)

から独立的に選択されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つが、式（1-2）の構造であり、

R^6 が、 H または CH_3 であり、

R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択され、

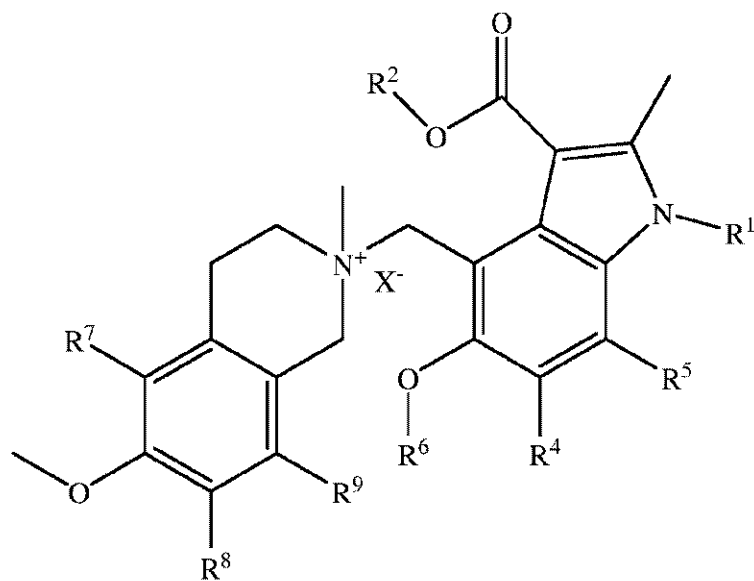
X^- が、前記化合物の正荷電部分を均衡させるアニオンであり、そして

前記式（1c）の化合物が、前記式（1c）の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、化合物。

（項目10）

前記化合物が、次の式：

【化51】



(1d)

を有する、項目9に記載の化合物。

（項目11）

前記化合物が、次の式：

10

20

30

40

50

10



20

30

【化 5 3】



50

R^1 が、Hまたは CH_3 であり、
 R^2 が、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、
 R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、
 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的に選択され、そして
 前記式(2b)の化合物が、前記式(2b)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、
 エナンチオマーおよび多形体を含む、化合物。

(項目18)

R^2 がエチルである、項目17に記載の化合物。

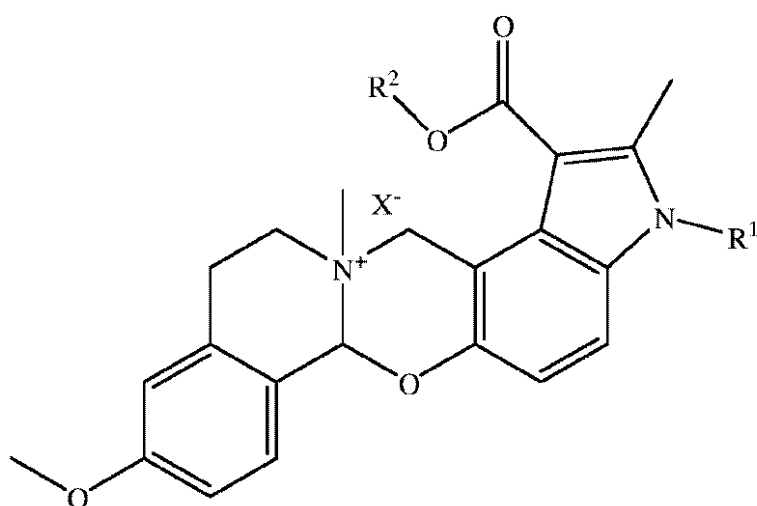
(項目19)

前記式(2b)の化合物が、単一のエナンチオマーである、項目17および18のいずれか一項に記載の化合物。

(項目20)

前記化合物が、次の式：

【化54】



(2c)

を有し、式中、 R^1 、 R^2 および X^- が、項目17に定義するものである、項目17に記載の化合物。

(項目21)

ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ4(M4)活性から生じる疾患または状態を被験体において処置する方法であって、前記方法が、薬学的有効量のM4特異的アンタゴニストを前記被験体に投与するステップを含み、前記M4特異的アンタゴニストが、
 次の式：

10

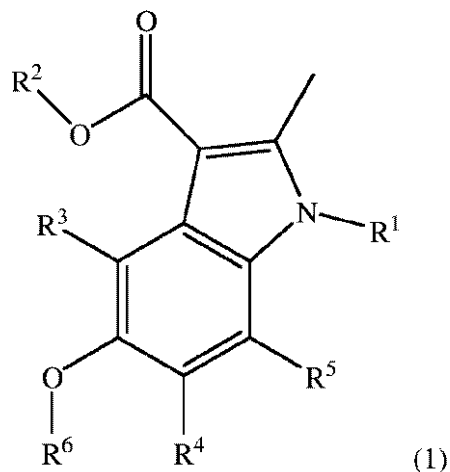
20

30

40

50

【化 5 5】



10

を有する化合物であり、式中、

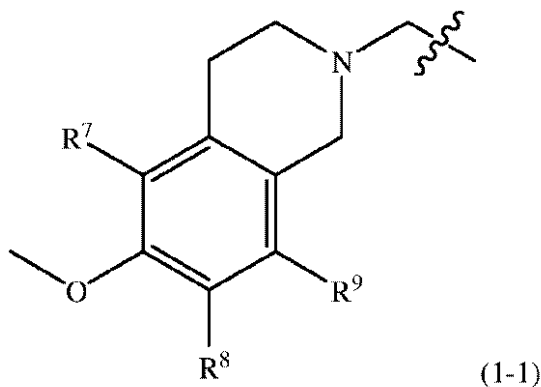
R^1 が、Hまたは CH_3 であり、

R^2 が、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、

R^3 、 R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SH、 SCH_3 および次の構造(1-1)：

20

【化 5 6】



30

から独立的に選択されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つが、式(1-1)の構造であり、

R^6 が、Hまたは CH_3 であり、

R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的に選択され、

そして前記式(1)の化合物が、前記式(1)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、方法。

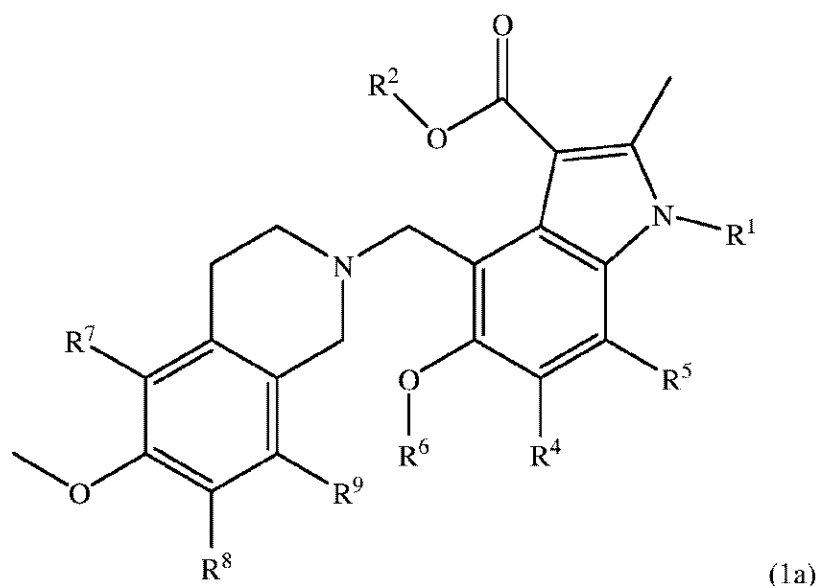
40

(項目 2 2)

前記化合物が、次の式：

50

【化 5 7】



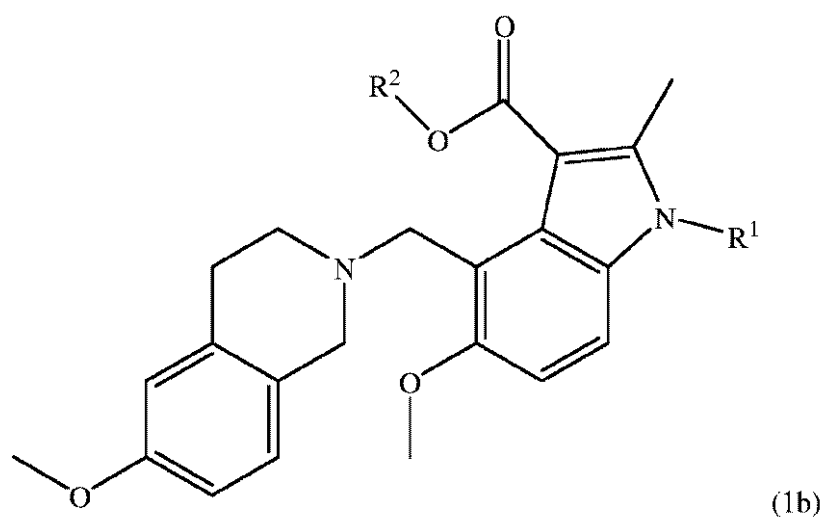
10

を有する、項目 2 1 に記載の方法。(項目 2 3)

20

前記化合物が、次の式：

【化 5 8】



30

を有する、項目 2 1 に記載の方法。(項目 2 4) R^1 が水素原子である、項目 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

40

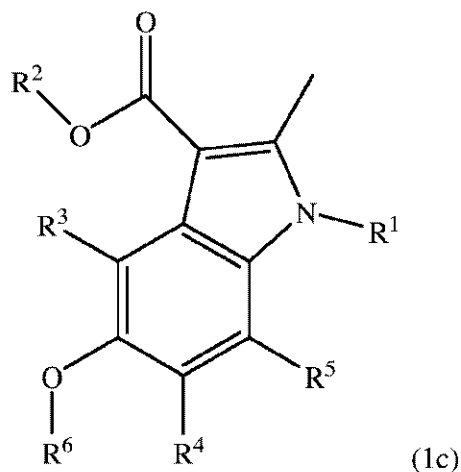
(項目 2 5) R^1 がメチルである、項目 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。(項目 2 6) R^2 がエチルである、項目 2 1 から 2 5 のいずれか一項に記載の方法。(項目 2 7) R^1 が水素原子であり、そして R^2 がエチルである、項目 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。(項目 2 8) R^1 がメチルであり、そして R^2 がエチルである、項目 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 29)

ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ 4 (M4) 活性から生じる疾患または状態を被験体において処置する方法であって、前記方法が、薬学的有効量の M4 特異的アンタゴニストを前記被験体に投与するステップを含み、前記 M4 特異的アンタゴニストが、次の式：

【化 59】



10

20

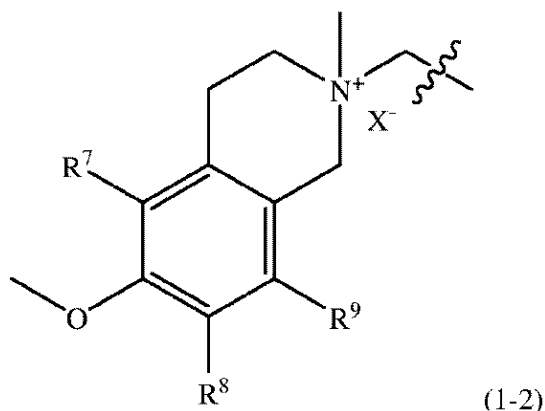
を有する化合物であり、式中、

R^1 が、H または CH_3 であり、

R^2 が、炭素原子 1 ～ 3 個を有する炭化水素基であり、

R^3 、 R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH 、 SCH_3 および次の構造 (1-2)：

【化 60】



30

から独立的に選択されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の 1 つまたは 2 つが、式 (1-2) の構造であり、

40

R^6 が、H または CH_3 であり、

R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、 OH 、 OCH_3 、 SH および SCH_3 から独立的に選択され、

X^- が、前記化合物の正荷電部分を均衡させるアニオンであり、そして

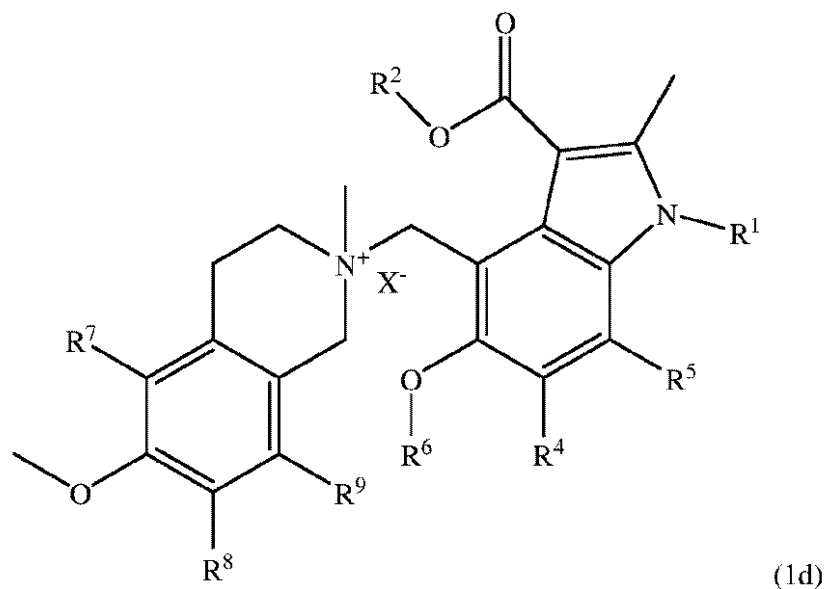
前記式 (1c) の化合物が、前記式 (1c) の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、方法。

(項目 30)

前記化合物が、次の式：

50

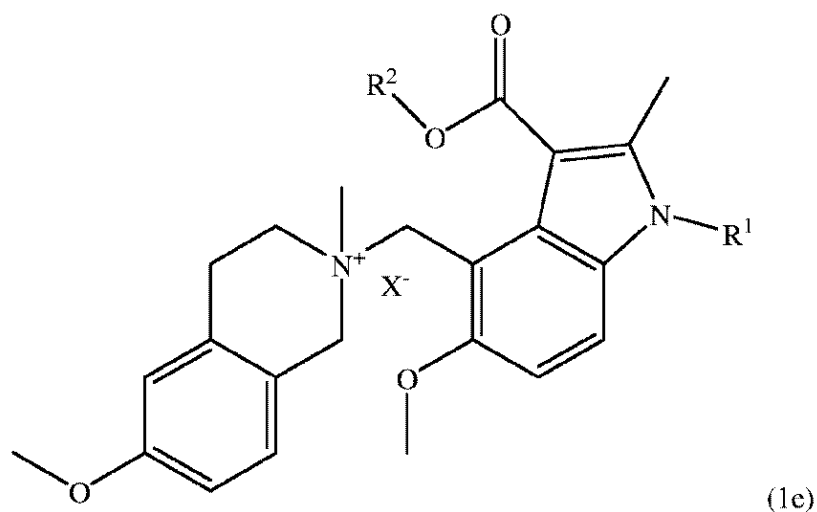
【化 6 1】



10

を有する、項目 2 9 に記載の方法。(項目 3 1)前記化合物が、次の式：

【化 6 2】



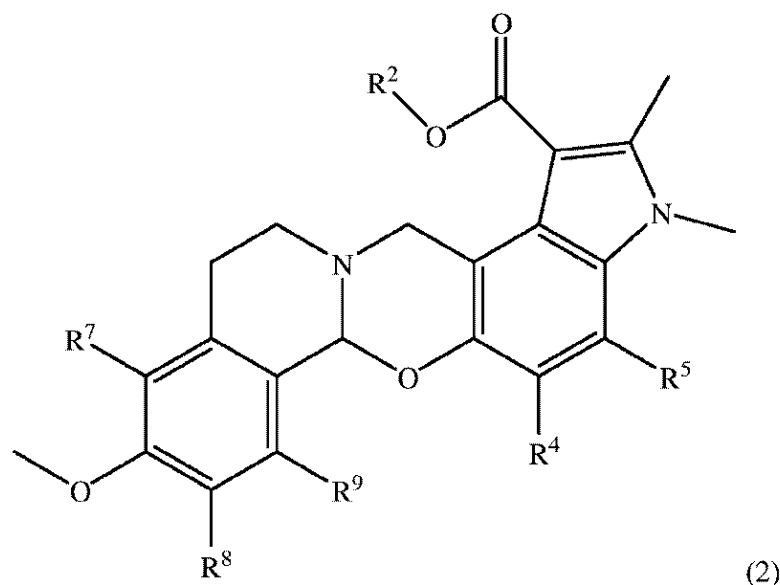
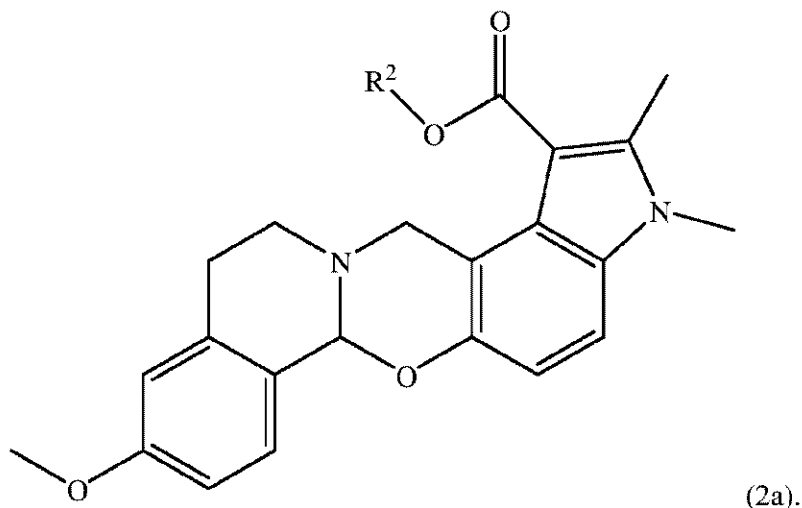
30

を有する、項目 2 9 に記載の方法。(項目 3 2)R¹が水素原子である、項目 2 9 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。(項目 3 3)R¹がメチルである、項目 2 9 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。(項目 3 4)R²がエチルである、項目 2 9 から 3 3 のいずれか一項に記載の方法。(項目 3 5)R¹が水素原子であり、そして R²がエチルである、項目 2 9 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。(項目 3 6)R¹がメチルであり、そして R²がエチルである、項目 2 9 から 3 1 のいずれか一項に記載の方法。

50

(項目 3 7)前記疾患または状態が、貧血である、項目 2 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の方法

o—

(項目 3 8)貧血を処置する方法であって、前記方法が、薬学的有効量の M 4 特異的アンタゴニストを被験体に投与するステップを含み、前記 M 4 特異的アンタゴニストが、次の式：【化 6 3】を有する化合物であり、式中、R²が、炭素原子 1 ～ 3 個を有する炭化水素基であり、R⁴、R⁵、R⁷、R⁸および R⁹が、水素原子、ハロゲン原子、CH₃、CF₃、OH、OCH₃、SH および SCH₃ から独立的に選択され、そして前記式 (2) の化合物が、前記式 (2) の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、方法。(項目 3 9)R²がエチルである、項目 3 8 に記載の方法。(項目 4 0)前記化合物が、次の式：【化 6 4】

を有する、項目 3 8 に記載の方法。

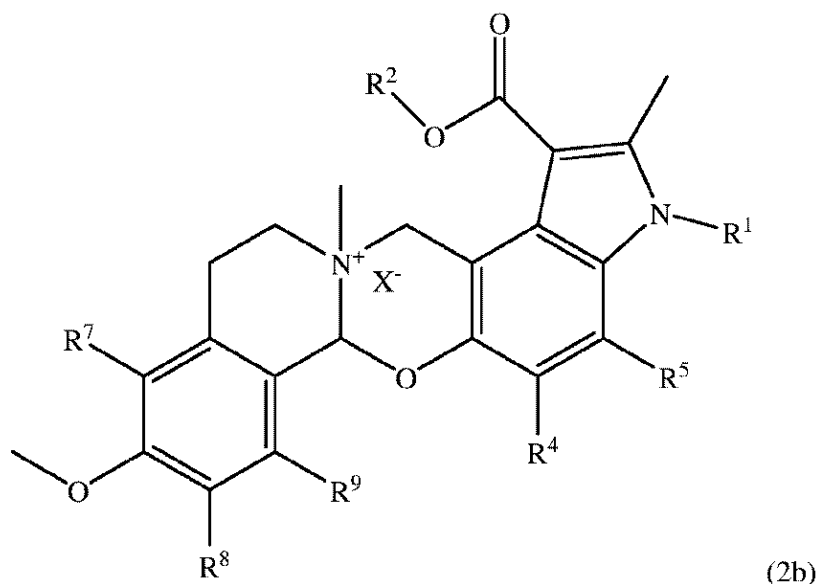
(項目 4 1)

R^2 がエチルである、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

ムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ 4 (M 4) 活性から生じる疾患または状態を被験体において処置する方法であって、前記方法が、薬学的有効量の M 4 特異的アンタゴニストを前記被験体に投与するステップを含み、前記 M 4 特異的アンタゴニストが、次の式：

【化 6 5】



を有する化合物であり、

R^1 が、H または CH_3 であり、

R^2 が、炭素原子 1 ~ 3 個を有する炭化水素基であり、

R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SH および SCH_3 から独立的に選択され、そして

前記式 (2 b) の化合物が、前記式 (2 b) の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、方法。

(項目 4 3)

R^2 がエチルである、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 4)

前記式 (2 b) の化合物が、単一のエナンチオマーである、項目 4 2 および 4 3 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 5)

前記化合物が、次の式：

10

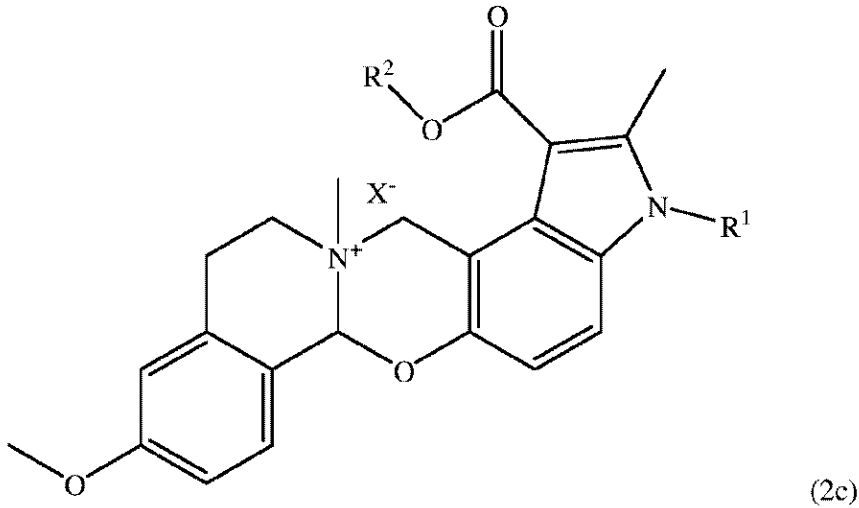
20

30

40

50

【化 6 6】



10

を有し、式中、 R^1 、 R^2 および X^- が、項目 4 6 に定義するものである、項目 4 2 に記載の方法。

(項目 4 6)

前記疾患または状態が、貧血である、項目 4 2 から 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

20

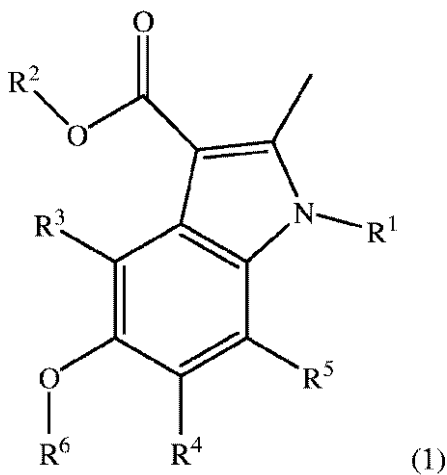
(項目 4 7)

赤芽球バースト形成単位 (BFU-E) 細胞の自己複製を促進するための方法であって、前記 BFU-E 細胞を M 4 特異的アンタゴニストと接触させるステップを含む、方法。

(項目 4 8)

前記 M 4 特異的アンタゴニストが、次の式：

【化 6 7】



30

を有する化合物であり、式中、

R^1 が、Hまたは CH_3 であり、

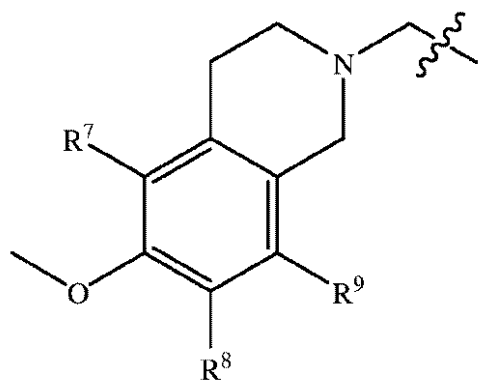
R^2 が、炭素原子 1 ~ 3 個を有する炭化水素基であり、

R^3 、 R^4 および R^5 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SH、 SCH_3 および次の構造 (1-1)：

40

50

【化 6 8】



(1-1)

10

から独立的选择されるが、ただし、 R^3 、 R^4 および R^5 の1つまたは2つが、式(1-1)の構造であり、

R^6 が、Hまたは CH_3 であり、

R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的选择され、

前記方法が、B F U-E細胞の自己複製の増加を生じ、そして

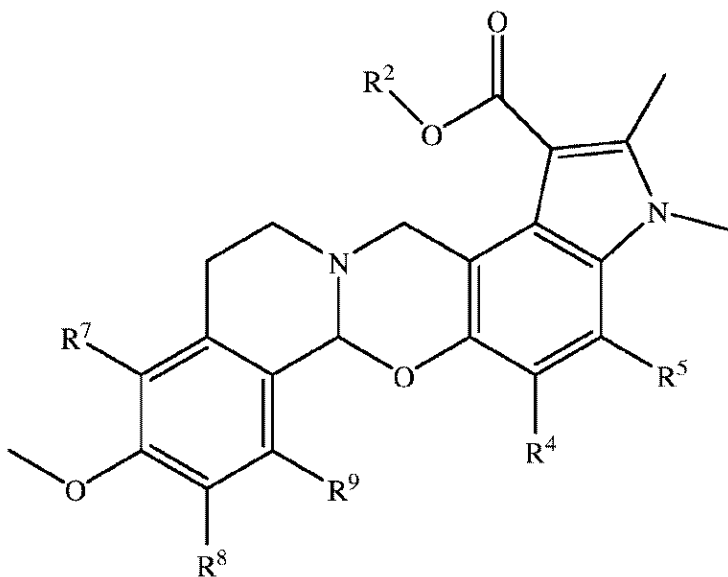
前記式(1)の化合物が、前記式(1)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、項目47に記載の方法。

20

(項目49)

前記M4特異的アンタゴニストが、次の式：

【化 6 9】



(2)

30

40

を有する化合物であり、式中、

R^2 が、炭素原子1~3個を有する炭化水素基であり、

R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的选择され、

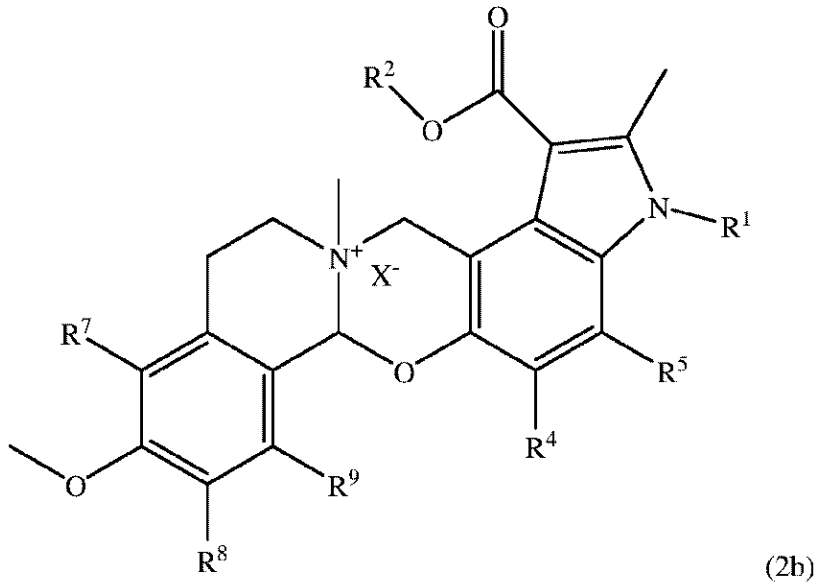
前記方法が、B F U-E細胞の自己複製の増加を生じ、そして

前記式(2)の化合物が、前記式(2)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、項目47に記載の方法。

(項目50)

50

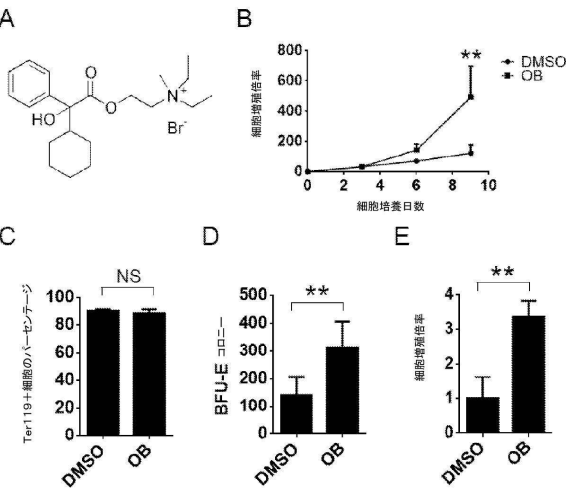
前記M 4 特異的アンタゴニストが、次の式：
【化 7 0】



を有する化合物であり、
 R^1 が、Hまたは CH_3 であり、
 R^2 が、炭素原子1～3個を有する炭化水素基であり、
 R^4 、 R^5 、 R^7 、 R^8 および R^9 が、水素原子、ハロゲン原子、 CH_3 、 CF_3 、OH、 OCH_3 、SHおよび SCH_3 から独立的に選択され、
 前記方法が、BFU-E細胞の自己複製の増加を生じ、そして
 前記式(2b)の化合物が、前記式(2b)の化合物の薬学的に許容される塩、溶媒和物、エナンチオマーおよび多形体を含む、項目47に記載の方法。
 (項目51)
 前記BFU-E細胞の自己複製の増加を利用して貧血を処置する、項目47から50のいずれか一項に記載の方法。

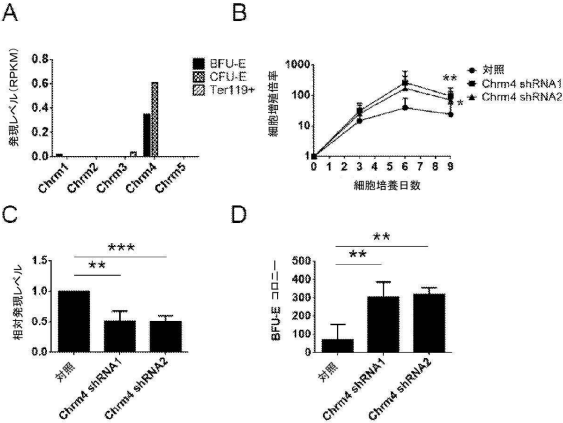
【図面】

【図 1】



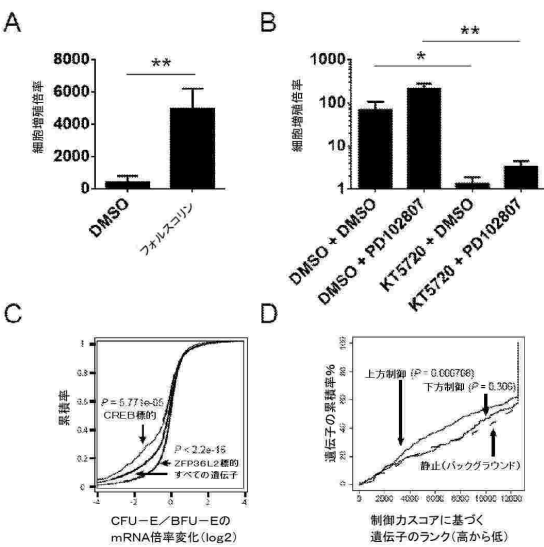
FIGS. 1A-1E

【図 2】



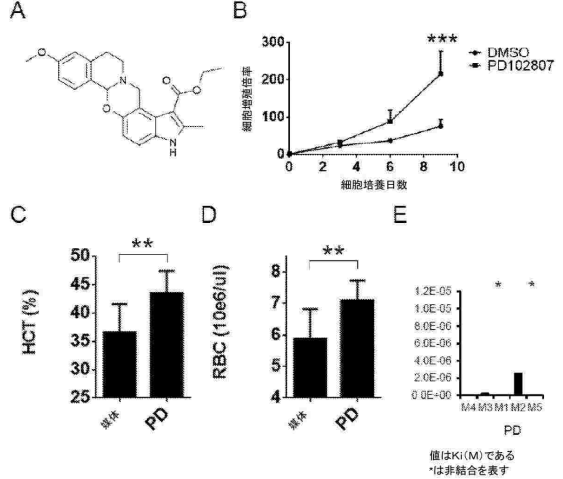
FIGS. 2A-2D

【図 3】



FIGS. 3A-3D

【図 4】



FIGS. 4A-4E

10

20

30

40

50

【図 5】

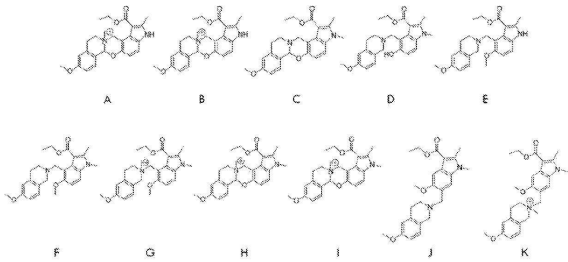


FIG. 5

【図 6】

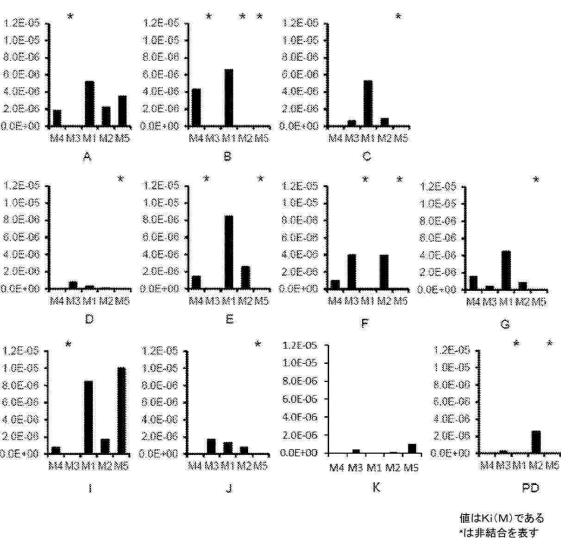


FIG. 6

【図 7】

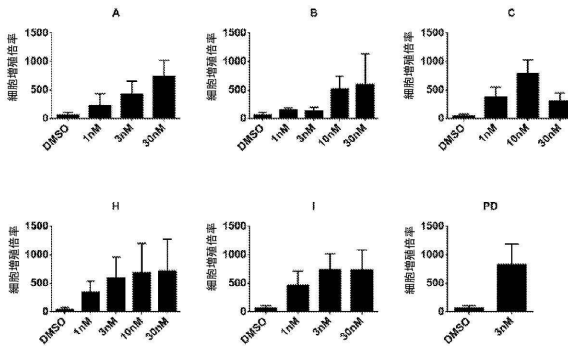


FIG. 7

【図 8】

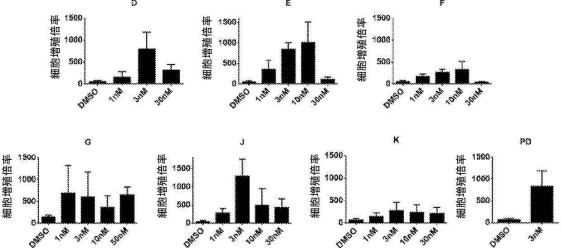


FIG. 8

【図 9】

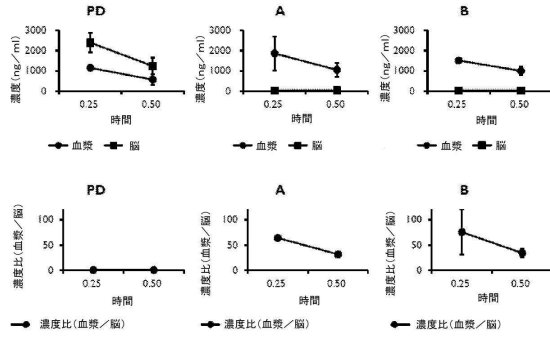


FIG. 9

【図 10】

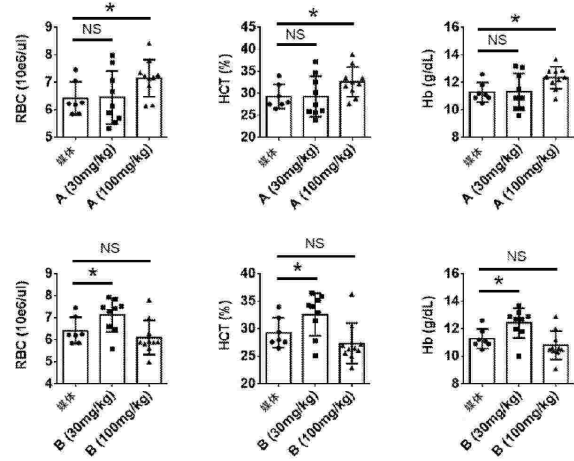


FIG. 10

【図 11】

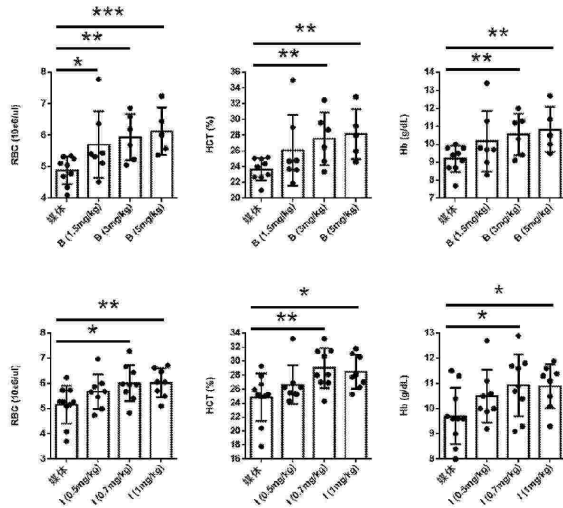


FIG. 11

【図 12】

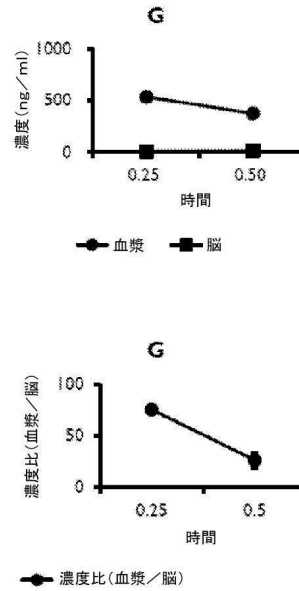


FIG. 12

フロントページの続き

- 弁理士 森下 夏樹
- (74)代理人 100181674
- 弁理士 飯田 貴敏
- (74)代理人 100181641
- 弁理士 石川 大輔
- (74)代理人 230113332
- 弁護士 山本 健策
- (72)発明者 アル アベド, ユーセフ
- アメリカ合衆国 ニューヨーク 11746, ディックス ヒルズ, モナ レーン 11
- (72)発明者 ジャン, リンボ
- アメリカ合衆国 ニューヨーク 11377, ウッドサイド, 46ティーエイチ ストリート 4
- 5-35, アpartment 1エー
- 審査官 水島 英一郎
- (56)参考文献 国際公開第2018/022668 (WO, A2)
- 特開2002-114786 (JP, A)
- Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1998年, 8, 1991-1996
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
- C07D
- C A p l u s (STN)
- R E G I S T R Y (STN)