

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7358466号

(P7358466)

(45)発行日 令和5年10月10日(2023.10.10)

(24)登録日 令和5年9月29日(2023.9.29)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 271/06 (2006.01)

C 0 7 D 271/06

C S P

A 6 1 K 31/4245(2006.01)

A 6 1 K 31/4245

A 6 1 P 11/00 (2006.01)

A 6 1 P 11/00

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 43/00 (2006.01)

A 6 1 P 43/00

1 1 1

請求項の数 13 (全18頁)

(21)出願番号 特願2021-525358(P2021-525358)

(86)(22)出願日 令和1年7月19日(2019.7.19)

(65)公表番号 特表2021-530565(P2021-530565

A)

(43)公表日 令和3年11月11日(2021.11.11)

(86)国際出願番号 PCT/CN2019/096842

(87)国際公開番号 WO2020/015745

(87)国際公開日 令和2年1月23日(2020.1.23)

審査請求日 令和4年4月14日(2022.4.14)

(31)優先権主張番号 201810804068.3

(32)優先日 平成30年7月20日(2018.7.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

中国(CN)

(73)特許権者 521028198

石薬集団中奇制薬技術(石家荘)有限公
司C S P C Z H O N G Q I P H A R M A
C E U T I C A L T E C H N O L O G Y
(S H I J I A Z H U A N G) C O . ,
L T D .中華人民共和國 0 5 0 0 3 5 河北省石家
荘市高新技术産業開発区黄河大道 2 2 6
号No . 2 2 6 , H u a n g h e S t r
e e t , H i g h - t e c h D e v e
l o p m e n t Z o n e , S h i j i
a z h u a n g , H e b e i 0 5 0 0
3 5 , C h i n a

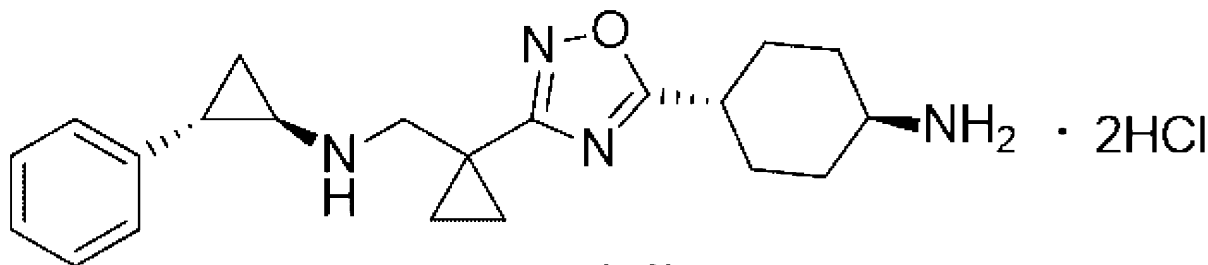
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 L S D 1 阻害剤の塩及びその結晶型

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

【化 1】



10

以上の式に示す化合物 I I I。

【請求項 2】

X線粉末回折(XRPD)パターンは、以下の2 角度、即ち $4.72 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.24 \pm 0.2^\circ$ 及び $21.78 \pm 0.2^\circ$ で特徴的回折ピークを有する、化合物 I I I の結晶型 A。

【請求項 3】

X線粉末回折パターンは、以下の2 角度、即ち $4.72 \pm 0.2^\circ$ 、 $14.24 \pm 0.2^\circ$

20

、 2° 、 $16.28 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $17.14 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $20.72 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $21.78 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $23.98 \pm 0.2^{\circ}$ 及び $24.96 \pm 0.2^{\circ}$ で特徴的回折ピークを有する、請求項 2 記載の結晶型 A。

【請求項 4】

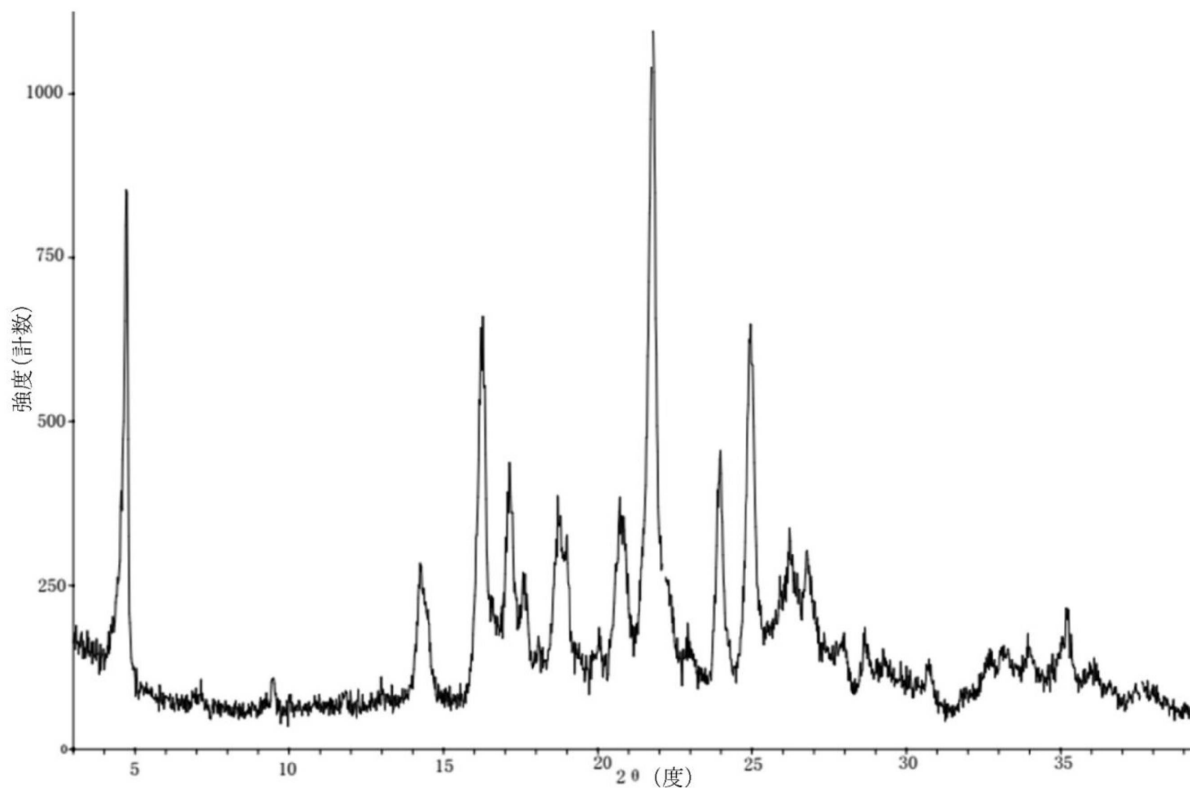
X 線粉末回折パターンは、以下の 2 角度、即ち $4.72 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $14.24 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $16.28 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $17.14 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $17.58 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $18.70 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $20.72 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $21.78 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $23.98 \pm 0.2^{\circ}$ 、 $24.96 \pm 0.2^{\circ}$ 及び $26.22 \pm 0.2^{\circ}$ で特徴的回折ピークを有する、請求項 3 記載の結晶型 A。

【請求項 5】

X 線粉末回折パターンは、以下の 2 角度、即ち 4.721° 、 9.479° 、 14.242° 、 16.279° 、 17.141° 、 17.581° 、 18.082° 、 18.702° 、 20.719° 、 21.780° 、 22.278° 、 23.978° 、 24.959° 、 26.22° 、 26.779° 、 27.358° 、 27.978° 、 28.656° 、 29.244° 、 30.738° 、 32.699° 、 33.159° 、 33.940° 、 35.201° 及び 37.637° で特徴的回折ピークを有する、請求項 4 記載の結晶型 A。

【請求項 6】

(図 1)



X R P D パターンは、前記図 1 に示すものである、請求項 5 記載の結晶型 A。

【請求項 7】

示差走査熱量曲線 (D S C) は、 194.66 ± 3 で 1 つの放熱ピークの開始点を有する、請求項 2 ~ 6 のいずれか一項記載の結晶型 A。

【請求項 8】

(図 2)

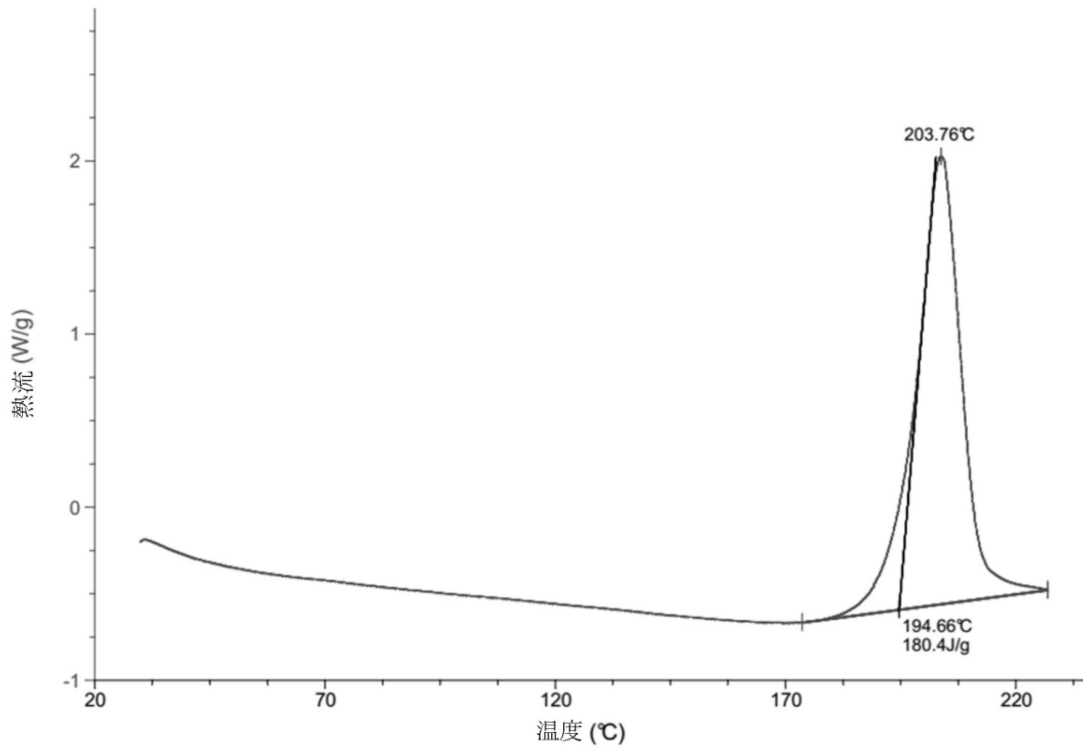
10

20

30

40

50



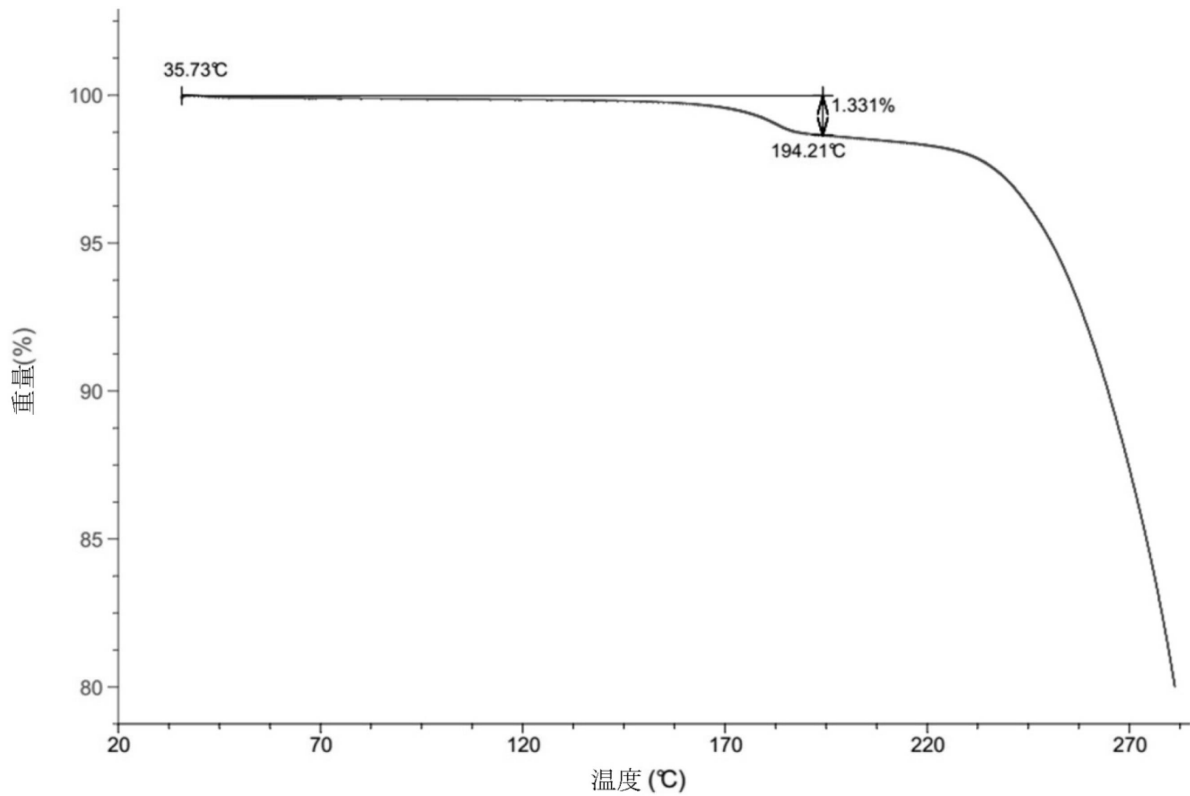
DSCサーモグラムは、前記図2に示すものである、請求項7記載の結晶型A。

【請求項9】

熱重量解析曲線(TGA)は、 194.21 ± 3 で重量損失が1.331%となる、請求項2～6のいずれか一項記載の結晶型A。

【請求項10】

(図3)



TGAサーモグラムは、前記図3に示すものである、請求項9記載の結晶型A。

【請求項11】

LSD1関連疾患を治療する医薬の製造に使用するための、請求項1記載の化合物III I 或いは請求項2～10のいずれか一項記載の結晶型A。

【請求項12】

肺癌を治療する医薬の製造に使用するための、請求項1記載の化合物III I 或いは請求項2～10のいずれか一項記載の結晶型A。

【請求項13】

前記肺癌が小細胞肺癌である、請求項12記載の化合物III I 或いは結晶型A。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明は、LSD1阻害剤である化合物III I 及びその結晶型、並びにLSD1関連疾患を治療する医薬の製造における当該化合物及びその結晶型の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

本願は、出願日2018年7月20日付き出願されたCN201810804068.3に基づいて、優先権を主張する。

【0003】

エピジェネティクスは、メチル化や脱メチル化などのようなヒストンに対する共有修飾、メチル化やメチロール化などようなDNAに対する共有修飾、及び核クロマチンの組み換えを含む様々なメカニズムによって遺伝子の発現を制御する。これらの修飾はDNAの基礎配列を変えないが、このようなエピジェネティクスの変化は、細胞分裂によって細胞ライフサイクル全体または細胞反復過程に持続的に存在する可能性がある[Adrian Bird, Nature, 2007, 396-398]。そのため、エピジェネティクス機能異常は、様々な実体腫瘍、血液腫瘍、ウイルス感染、神経異常などの様々な疾患の病理過程を引き起こし、関与する。そのため、エピジェネティクスは、現在、医薬開発分野の研究の焦点となっている。リシン特異的脱メチル化酵素(LSD1はKDM1Aとも呼ばれる)は、2004年に発見された初めての脱メチル化酵素であり、フラビンアデニディヌクレオチド(FAD)依存のアミノオキシダーゼファミリーに属する。LSD1の構造は、N-末端のSWIRMドメイン、C-末端のアミノオキシダーゼドメイン(AOL)、及び中央に突出するTowerドメインという3つの主要部分を含む。C-末端のアミノオキシダーゼドメインは2つの活性ポケットを含み、1つはFDAと結合するためのサイトであり、もう1つは基質を識別してそれと結合するためのサイトである。SWIRMドメインの機能について、明確な結論はないが、FADや基質との結合に直接関与していないもの、この領域の変異や除去はLSD1の活性を低下させるため、この領域は配座を調整することにより活性領域の作用に影響を及ぼす可能性があると推察される。TowerドメインはLSD1と他のタンパク質因子との結合ドメインである。LSD1は異なるタンパク質因子と結合した後、異なる基質に作用することにより、ヒストン及び遺伝子の発現にそれぞれの制御作用を果たす。例えば、LSD1はCORESTと結合すると、ヒストンH3K4に優先的に作用し、脱メチル化により活性化に関与するヒストンマーカールを除去し、遺伝子転写を阻害する。一方、アンドロゲン受容体タンパク質と結合すると、組換えされたLSD1がH3K9に優先的に作用し、脱メチル化によりアンドロゲン受容体に関連する遺伝子転写が活性化される。また、LSD1には、p53、E2F1、DNMT1、MYPT1などの非ヒストン受容体もある。

20

30

40

【0004】

LSD1はFAD依存のアミノオキシダーゼであり、その中、プロトン転移が最も可能な酸化機構であると考えられる。まず、プロトン転移により基質のN-CH₃結合がイミド結合に変換され、このイミドイオン中間体が加水分解反応を起こし、メチル除去されたアミンを生成しながら、ホルムアルデヒドを生成する。この触媒サイクルの過程で、FAD

50

は F A D H₂ に還元され、その後、一分子の酸素により F A D に酸化され、同時に一分子の H₂O₂ が生成される。

【 0 0 0 5 】

L S D 1 はエピジェネティクスに不可欠なレギュレータであり、脱メチル化作用によりヒストンを修飾するため、生体内の「消しゴム」酵素とも呼ばれている。L S D 1 は遺伝子の発現を制御し、さらに細胞の増殖と分化過程を制御することができる。

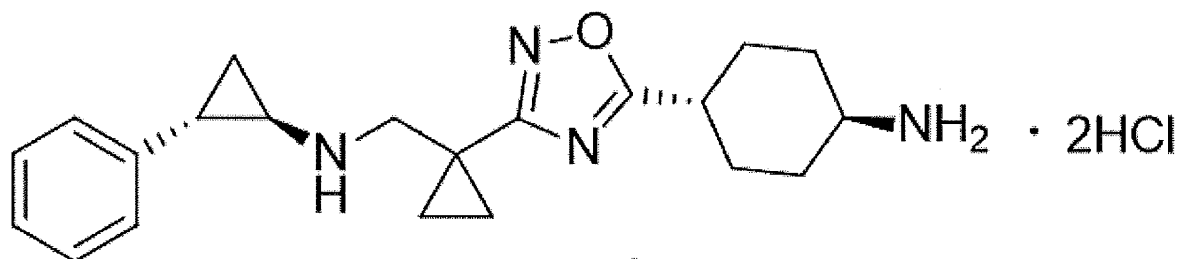
【発明の概要】

【 0 0 0 6 】

本発明は、化合物 I I I を提供する。

【 0 0 0 7 】

【化 2 】



化合物III

【 0 0 0 8 】

本発明は、さらに、X線粉末回折 (X R P D) パターンが以下の 2 角度で特徴的回折ピークを有する化合物 I I I の結晶型 A を提供する：4 . 7 2 ± 0 . 2 °、1 4 . 2 4 ± 0 . 2 ° 及び 2 1 . 7 8 ± 0 . 2 °。

【 0 0 0 9 】

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の X 線粉末回折パターンは、以下の 2 角度で特徴的回折ピークを有する：4 . 7 2 ± 0 . 2 °、1 4 . 2 4 ± 0 . 2 °、1 6 . 2 8 ± 0 . 2 °、1 7 . 1 4 ± 0 . 2 °、2 0 . 7 2 ± 0 . 2 °、2 1 . 7 8 ± 0 . 2 °、2 3 . 9 8 ± 0 . 2 ° 及び 2 4 . 9 6 ± 0 . 2 °。

【 0 0 1 0 】

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の X 線粉末回折パターンは、以下の 2 角度で特徴的回折ピークを有する：4 . 7 2 ± 0 . 2 °、1 4 . 2 4 ± 0 . 2 °、1 6 . 2 8 ± 0 . 2 °、1 7 . 1 4 ± 0 . 2 °、1 7 . 5 8 ± 0 . 2 °、1 8 . 7 0 ± 0 . 2 °、2 0 . 7 2 ± 0 . 2 °、2 1 . 7 8 ± 0 . 2 °、2 3 . 9 8 ± 0 . 2 °、2 4 . 9 6 ± 0 . 2 ° 及び 2 6 . 2 2 ± 0 . 2 °。

【 0 0 1 1 】

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の X 線粉末回折パターンは、以下の 2 角度で特徴的回折ピークを有する：4 . 7 2 1 °、9 . 4 7 9 °、1 4 . 2 4 2 °、1 6 . 2 7 9 °、1 7 . 1 4 1 °、1 7 . 5 8 1 °、1 8 . 0 8 2 °、1 8 . 7 0 2 °、2 0 . 7 1 9 °、2 1 . 7 8 0 °、2 2 . 2 7 8 °、2 3 . 9 7 8 °、2 4 . 9 5 9 °、2 6 . 2 2 °、2 6 . 7 7 9 °、2 7 . 3 5 8 °、2 7 . 9 7 8 °、2 8 . 6 5 6 °、2 9 . 2 4 4 °、3 0 . 7 3 8 °、3 2 . 6 9 9 °、3 3 . 1 5 9 °、3 3 . 9 4 0 °、3 5 . 2 0 1 ° 及び 3 7 . 6 3 7 °。

【 0 0 1 2 】

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の X R P D パターンは、基本的に図 1 に示すようなものである。

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の X R P D パターンの解析データは、表 1 に示すようなものである。

【 0 0 1 3 】

【表 1 - 1】

表 1：結晶型 A の XRPD パターンの解析データ

番号	2θ (°)	面間隔 (Å)	背景	強度	相対的強度 (%)	面積	面積 %	半値幅
1	4.721	18.7027	77	776	82.6	11380	67.8	0.249
2	9.479	9.3229	62	46	4.9	418	2.5	0.155
3	14.242	6.2139	75	208	22.2	4345	25.9	0.355
4	16.279	5.4406	73	587	62.4	12072	72	0.35
5	17.141	5.1688	73	364	38.7	7120	42.4	0.333
6	17.581	5.0405	73	196	20.8	6533	38.9	0.567
7	18.082	4.9018	73	99	10.5	1030	6.1	0.177
8	18.702	4.7408	137	249	26.5	5177	30.9	0.353
9	20.719	4.2836	153	231	24.5	3782	22.5	0.279
10	21.78	4.0773	155	940	100	16777	100	0.304
11	22.278	3.9873	115	143	15.2	7131	42.5	0.846
12	23.978	3.7082	121	334	35.6	4100	24.4	0.209
13	24.959	3.5647	153	495	52.7	7533	44.9	0.259
14	26.22	3.3961	168	169	18	4286	25.5	0.432
15	26.779	3.3264	173	130	13.8	2327	13.9	0.305
16	27.358	3.2573	92	71	7.6	2553	15.2	0.61
17	27.978	3.1865	92	85	9.1	1421	8.5	0.284
18	28.656	3.1126	96	89	9.5	1567	9.3	0.299
19	29.244	3.0514	91	62	6.6	2223	13.3	0.613
20	30.738	2.9064	58	79	8.4	1769	10.5	0.381
21	32.699	2.7364	70	83	8.9	4417	26.3	0.902
22	33.159	2.6995	70	88	9.4	4082	24.3	0.786
23	33.94	2.6392	70	106	11.3	2576	15.4	0.412
24	35.201	2.5474	104	111	11.8	1810	10.8	0.278
25	37.637	2.388	68	35	3.7	1058	6.3	0.514

【0014】

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の示差走査熱量曲線 (DSC) は、 194.66 ± 3 で放熱ピークの開始点を有する。

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の DSC サーモグラムは、基本的に図 2 に示すようなものである。

【0015】

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の熱重量解析曲線 (TGA) は、 194.21 ± 3 で重量損失が 1.331% となる。

本発明のいくつかの形態では、上記の結晶型 A の TGA サーモグラムは、基本的に図 3 に示すようなものである。

【0016】

本発明は、さらに、LSD1 関連疾患を治療する医薬の製造における上記の化合物 III 或上記の結晶型 A の使用を提供する。

本発明は、さらに、肺癌、特に小細胞肺癌を治療する医薬の製造における上記の化合物 III 或上記の結晶型 A の使用を提供する。

【発明の効果】

【0017】

本発明化合物 III 及びその結晶型 A は、良好な LSD1 阻害活性及び優れた体内投与効力を有し、かつ、そのフリー塩基及びその他の塩と比較して、良好な安定性を有し、光

・熱・湿度による影響が小さく、溶解性が非常によく、製薬における見込みが良い。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 8 】

【図 1】化合物 I I I の結晶型 A の C u - K 照射による X R P D パターンである。

【図 2】化合物 I I I の結晶型 A の D S C サーモグラムである。

【図 3】化合物 I I I の結晶型 A の T G A サーモグラム。

【図 4】化合物 I I I の結晶型 A の D V S 等温線である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 9 】

定義及び説明

特に明記されていない限り、本明細書で使用する以下の用語及び語句は以下の意味を含むことを目的とする。一つの特定の語句又は用語が特に定義されない場合、未確定又は不明瞭とされるべきでなく、一般的な意味に従って理解されるべきである。商品名が現れた場合、それに対応する商品又はその活性成分を指すことを目的とする。

【 0 0 2 0 】

本発明の中間体化合物は、以下に挙げられる具体的な実施形態、それとその他の化学合成方法とを組み合わせる実施形態、及び当業者によく知られる同等な組み替え形態を含む、当業者によく知られる複数の合成方法により製造されることができ、好ましい実施形態は、本発明の実施例を含むが、これらに限定されない。

【 0 0 2 1 】

本発明の具体的な実施形態の化学反応は、適切な溶媒において完成されるものであり、前記の溶媒は、本発明の化学変化及び必要な試薬及び材料に適する必要がある。本発明の化合物を取得するために、当業者は、場合によって、既知の実施形態に基づいて合成工程又は反応の流れを改変又は選択する必要がある。

【 0 0 2 2 】

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、これらの実施例は、本発明になんらかの限定をするものではない。

本発明で使用される全ての溶媒は、市販のものであり、さらなる精製を必要なく使用することができる。

【 0 0 2 3 】

本発明で使用される溶媒は、市販により入手することができる。本発明では、以下の略称を採用する。D C M は、ジクロロメタン；D M F は、N , N - ジメチルホルムアミド；D M S O は、ジメチルスルホキシド；E t O H は、エタノール；M e O H は、メタノール；T F A は、トリフルオロ酢酸；T s O H は、p - トシル酸；m p は、融点；E t S O ₃ H は、エタンスルホン酸；M e S O ₃ H は、メタンスルホン酸；A T P は、アデノシン三リン酸；H E P E S は、4 - ヒドロキシエチルピペラジニエタンスルホン酸；E G T A は、エチレングリコールビス(2 - アミノエチルエーテル)テトラ酢酸；M g C l ₂ は、二塩化マグネシウム；M n C l ₂ は、二塩化マンガン；D T T は、ジチオトレイトール；D C C は、ジシクロヘキシルカルボジイミド；D M A P は、4 - ジメチルアミノピリジンを示す。

【 0 0 2 4 】

本発明の X 線粉末回折 (X - r a y p o w d e r d i f f r a c t o m e t e r , X R P D) 法

機器型番：D X - 2 7 0 0 B H X 線回折機

測定方法：約 1 0 ~ 2 0 m g 試料を X R P D 検出に使用する。

詳細な X R P D パラメータは、以下の通りである。

線源：C u , k - A l p h a 1 (λ = 1 . 5 4 1 8 4 Å)

管電圧：4 0 k V , 管電流：3 0 m A

発散スリット：1 m m

第 1 のソーラーリット：2 8 m m , 第 2 のソーラーリット：2 8 m m

受光スリット：0 . 3 m m , 散乱防止スリット：1 m m

10

20

30

40

50

測定時間：0.5 s

スキャン角度範囲：3 ~ 40 deg

ステップ角度：0.02 deg

【0025】

本発明の示差熱量解析 (Differential Scanning Calorimeter, DSC) 方法

機器型番：TA Q2000 示差走査熱量計

測定方法：試料 (~ 1 mg) をとり、DSC アルミパン内に置いて測定を行い、50 mL/min N₂ 条件で、以 10 /min の昇温速率で試料を 30 (室温) から 300 (又は 350) まで加熱する。

10

【0026】

本発明の熱重量解析 (Thermalgravimetric Analyzer, TGA) 方法

機器型番：TA Q5000 熱重量解析計

測定方法：試料 (2 ~ 5 mg) をとり、TGA プラチナパン内に置いて測定を行い、25 mL/min N₂ 条件で、以 10 /min の昇温速率で試料を室温から 300 又は重量損失 20 % となるまで加熱する。

【0027】

本発明の動的蒸気吸着解析 (Dynamic Vapor Sorption, DVS) 方法

機器型番：SMS DVS Advantage 動的蒸気吸着計

測定条件：試料 (10 ~ 15 mg) をとり、DVS 試料プレートに置いて測定を行う。

20

【0028】

詳細な DVS パラメータは、以下の通りである。

温度：25

バランス：dm/dt = 0.01 %/min (最短：10 min, 最長：180 min)

乾燥：0 % RH で 120 min 乾燥する

RH (%) 測定勾配：10 %

RH (%) 測定勾配範囲：0 % - 90 % - 0 %

吸湿性評価の分類は以下の通りである。

30

【0029】

【表 1 - 2】

吸湿性分類	$\Delta W\%$
吸湿分解	十分な量の水分を吸収して液状となる
極めて強い吸湿性	$\Delta W\% \geq 15\%$
吸湿性あり	$15\% > \Delta W\% \geq 2\%$
吸湿性ややあり	$2\% > \Delta W\% \geq 0.2\%$
吸湿性なし又はほとんどなし	$\Delta W\% < 0.2\%$

40

【0030】

注：W % は、被験品が 25 ± 1 及び $80 \pm 2\%$ RH での吸湿による重量増加である。

【実施例】

【0031】

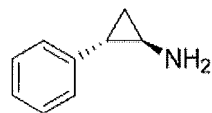
本発明の内容をより理解させるために、以下に具体的な実施例を参照しながらさらに説明するが、具体的な実施形態は、本発明の内容に限定するものでない。

実施例 1：化合物 I の製造

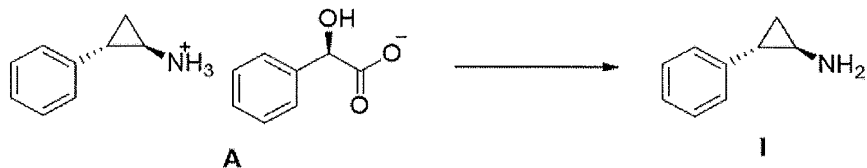
【0032】

50

【化 3】



合成スキーム：



10

【0033】

化合物水酸化ナトリウム (279 g, 6.99 mol) を水 (3.00 L) に溶解して、温度を 10 程度に制御しながら化合物 A (997 g, 3.49 mol) を段階的に分けて添加し、固体が完全に溶解し、酢酸エチル (2.00 L x 2) で抽出し、有機相を合併し、有機相を順次に水 (1.50 L)、飽和食塩水 (1.50 L) で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、ろ液を減圧濃縮し、化合物 I を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.18 - 7.14 (m, 2H) 7.07 - 7.05 (m, 1H) 6.94 - 6.92 (m, 2H) 2.47 - 2.44 (m, 1H) 1.78 - 1.76 (m, 1H) 0.97 - 0.94 (m, 1H) 0.92 - 0.89 (m, 1H)。

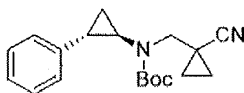
20

【0034】

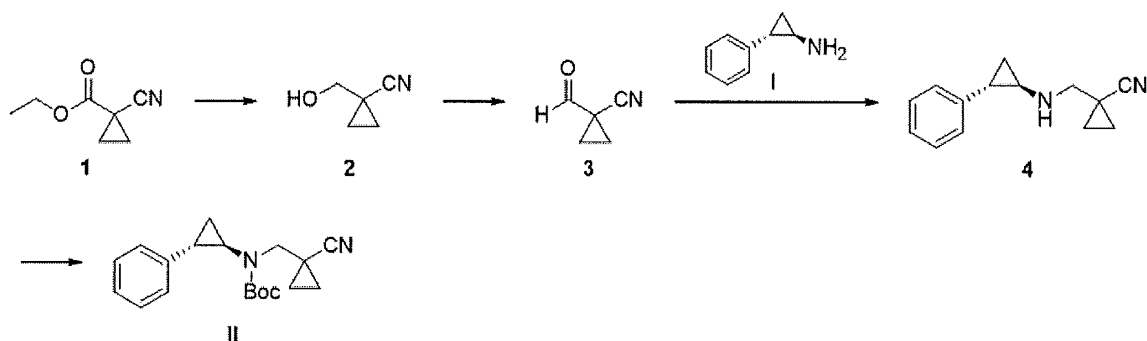
実施例 2：化合物 II の製造

【0035】

【化 4】



合成スキーム：



30

【0036】

第 1 工程

化合物 1 (260 g, 1.87 mol) をテトラヒドロフラン (2.00 L) 及びメタノール (200 mL) に溶解して、温度を 20 に制御しながら水素化ホウ素ナトリウム (70.8 g, 1.87 mol) を段階的に分けて添加し、反応液を 20 で 18 時間撹拌した。0 で飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (2.00 L) を滴下し、気泡の生成が停止するまで反応をクエンチングし、少量の固体が生成した。濾過し、固体残渣を酢酸エチル (1.00 L x 2) で洗浄し、ろ液に飽和となるまで固体塩化ナトリウムを添加し、液相分離し、有機相を飽和食塩水 (1.00 L) で洗浄した。合併された水相を酢酸エチル及びテトラヒドロフランの混合溶液 (酢酸エチル：テトラヒドロフラン = 10:1, 1.00

40

50

L x 3) で抽出し、合併された有機相を飽和食塩水 (1.00 L) で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧濃縮し、化合物 2 を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 3.63 (s, 2H) 2.20 (s, 1H) 1.29 (dd, J₁ = 5.2 Hz, J₂ = 2.0 Hz, 2H) 0.99 (dd, J₁ = 5.2 Hz, J₂ = 2.0 Hz, 2H)。

【0037】

第2工程

化合物 2 (101 g, 1.04 mol) を無水ジクロロメタン (1.50 L) に溶解して、温度を 5 から 10 まで制御しながら、デスマーチン試薬 (486 g, 1.14 mol) を段階的に分けて添加し、反応液を 25 で 12 時間攪拌し、温度を 15 に制御しながら、反応液にゆっくり飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (4.00 L) を添加し、さらにゆっくりと飽和硫代硫酸ナトリウム溶液 (4.00 L) を添加し、30 分攪拌し、静置で液相分離し、水相をジクロロメタン (1.00 L x 3) で抽出し、有機相を合併し、有機相を順次に水 (1.00 L x 1)、飽和食塩水 (1.00 L x 1) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、減圧濃縮し、化合物 3 を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 9.31 (s, 1H) 1.71 - 1.68 (m, 4H)。

【0038】

第3工程

化合物 I (97.5 g, 732 mmol) 及び化合物 3 (83.5 g, 878 mmol) を無水ジクロロメタン (1.50 L) に溶解して、酢酸 (4.40 g, 73.2 mmol) を反応液に添加し、反応液を 26 で 4 時間攪拌し、トリアセチルオキシ水素化ホウ素ナトリウム (232 g, 1.10 mol) を添加し、反応液を 25 で 12 時間攪拌し、反応液に気泡の生成が停止するまでゆっくりと飽和炭酸水素ナトリウム溶液 (3.50 L) を添加し、静置で液相分離し、水相をジクロロメタン (1.00 L x 1) で抽出し、有機相を合併し、減圧濃縮で有機溶媒を除去し、残留物に水 (800 mL) を添加し、塩酸水溶液 (1 M) で pH 3 まで調整し、tert-ブチルメチルエーテル (800 mL x 2) で抽出し、水相を飽和炭酸水素ナトリウムで pH 8 まで調整し、ジクロロメタン (1.00 L x 2) で抽出し、有機相を合併し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、化合物 4 を得た。

【0039】

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.29 - 7.26 (m, 2H) 7.19 - 7.16 (m, 1H) 7.06 - 7.04 (m, 2H) 2.83 (s, 2H) 2.51 - 2.48 (m, 1H) 2.01 - 1.96 (m, 1H) 1.28 - 1.24 (m, 2H) 1.18 - 1.13 (m, 1H) 1.05 - 1.01 (m, 1H) 0.88 - 0.79 (m, 2H)。

MS - ESI 計算値 [M + H]⁺ 213, 実測値 213。

【0040】

第4工程

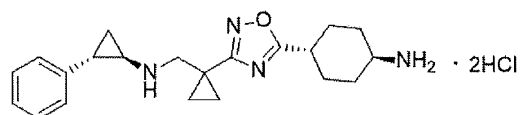
化合物 4 (113 g, 534 mmol) をテトラヒドロフラン (1.20 L) 及び水 (300 mL) に溶解して、ジ t-ブチルジカルボネート (128 g, 588 mmol) 及び一水和水酸化リチウム (26.9 g, 641 mmol) を反応液に添加し、反応液を 25 で 12 時間攪拌し、塩酸水溶液 (1 M) で pH 3 まで調整し、酢酸エチル (800 mL x 2) で抽出し、有機相を飽和食塩水 (1.00 L x 1) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮し、残留物に n-ヘプタン (1.00 L) を添加し、12 時間攪拌し、大量な白色固体が生成し、濾過し、濾過ケーキを減圧乾燥して、化合物 II を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.23 - 7.21 (m, 2H) 7.13 - 7.10 (m, 1H) 7.07 - 7.05 (m, 2H) 3.42 - 3.31 (m, 2H) 2.90 - 2.88 (m, 1H) 2.10 - 2.05 (m, 1H) 1.37 (s, 9H) 1.28 - 1.16 (m, 4H) 1.00 - 0.90 (m, 2H)。MS - ESI 計算値 [M + H]⁺ 313, 実測値 313。

【 0 0 4 1 】

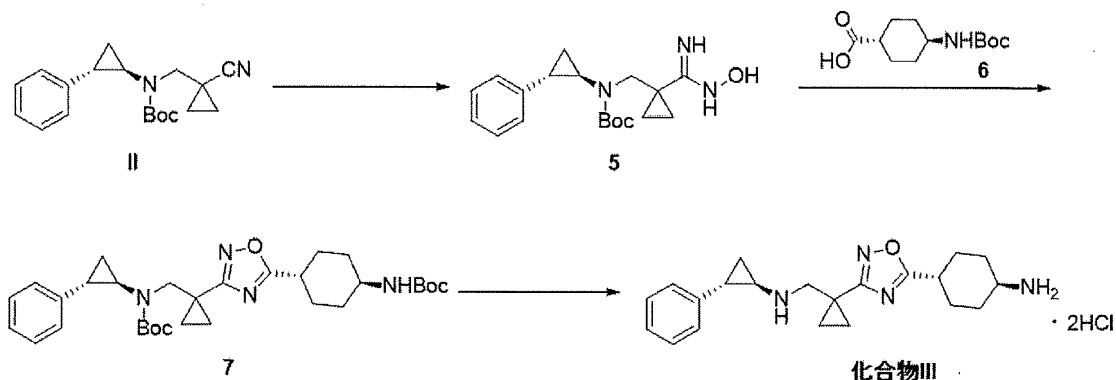
実施例 3：化合物 I I I 及びその結晶型 A の製造

【 0 0 4 2 】

【 化 5 】



合成スキーム：



10

20

【 0 0 4 3 】

第 1 工程

室温条件で、化合物 I I (202 g, 647 mmol) を無水エタノール (500 mL) に溶解して、撹拌しながらジイソプロピルエチルアミン (209 g, 1.62 mol) 及び塩酸ヒドロキシアミン (90.0 g, 1.30 mol) を添加した。反応液を 80 まで昇温し、撹拌しながら 16 時間反応した。反応液を室温まで冷却し、減圧濃縮してエタノールを除去し、残留物を酢酸エチル (2.00 L) で溶解し、有機相を水 (500 mL × 3) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、ろ液を濃縮し、濃縮物を酢酸エチル (200 mL) で溶解し、撹拌条件で混合物に n - ヘプタン (2.00 L) を添加し、12 時間撹拌し、白色固体が析出し、濾過し、濾過ケーキを n - ヘプタン (200 mL) で洗浄し、濾過ケーキを 45 条件で 12 時間真空乾燥し、化合物 5 を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO - d₆) 8.92 (s, 1H) 7.27 - 7.23 (m, 2H) 7.16 - 7.08 (m, 3H) 5.26 (s, 2H) 3.53 - 3.50 (m, 1H) 3.32 - 3.28 (m, 1H) 2.78 - 2.76 (m, 1H) 2.03 - 2.00 (m, 1H) 1.33 (s, 9H) 1.14 - 1.11 (m, 2H) 0.71 - 0.59 (m, 4H)。MS - ESI 計算値 [M + H]⁺ 346, 実測値 346。

30

【 0 0 4 4 】

第 2 工程

化合物 6 (126 g, 532 mmol) を無水 N, N - ジメチルホルムアミド (1.40 L) に溶解して、30 度で窒素保護でカルボニルジイミダゾール (88.8 g, 557 mmol) を添加し、そして 3 時間撹拌し、反応液に化合物 5 (175 g, 506 mmol) を添加し、反応液を 110 まで昇温し、12 時間撹拌反応した。反応液を室温まで冷却し、反応液を撹拌条件でゆっくりと水 (14 L) に添加し、大量な白色固体が析出し、濾過し、濾過ケーキを水 (3 L × 3) で洗浄し、濾過ケーキを 30 条件で真空乾燥し、化合物 7 を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) 7.28 - 7.23 (m, 2H) 7.17 - 7.14 (m, 1H) 7.06 - 7.05 (m, 2H) 4.43 - 4.41 (m, 1H) 3.88 - 3.70 (m, 2H) 3.48 - 3.47 (m, 1H) 2.76 - 2.73 (m, 2H) 2.14 - 2.07 (m, 5H) 1.64 - 1.61 (m, 2H) 1.46 (s, 9H) 1.41 (s, 9H) 1.24 - 1.00 (m, 7H)。MS - ESI 計算値 [M + Na]⁺ 575, 実測値 575。

40

50

【 0 0 4 5 】

第 3 工程

化合物 7 (2 4 0 g , 4 3 4 m m o l) を酢酸エチル (2 4 0 m L) に溶解して、0 で
 攪拌条件で塩酸酢酸エチル溶液 (4 M , 8 2 0 m L) を添加し、0 ~ 2 5 で 3 時間攪
 拌反応し、大量な白色固体が析出し、濾過し、濾過ケーキを酢酸エチル (5 0 0 m L x 5
) で洗浄し、濾過ケーキを 4 0 条件で真空乾燥し、化合物 I I I を得た。化合物 I I I
 を無水エタノール (1 . 2 0 L) に添加し、攪拌しながら昇温し、固体が全部溶解するま
 で還流し、熱のまま濾過して、機械的不純物を除去し、ろ液に少量の固体が析出し、引き
 続き固体が全部溶解するまで還流し、攪拌を停止し、ろ液を 1 から 2 時間ごとに 1 0 ~
 2 0 降温し、4 5 まで降温した後に 1 2 時間温度を維持し、大量な白色固体が析出し
 、ろ液を再び 1 から 2 時間ごとに 1 0 ~ 2 0 降温し、2 5 まで降温し、均一に攪拌
 し、濾過し、濾過ケーキをイソプロパノール (2 6 0 m L x 3) で洗浄し、濾過ケーキを
 4 5 条件で真空乾燥し、X R P D により検出し、化合物 I I I の結晶型 A を得た。¹H
 N M R (4 0 0 M H z , C D ₃ O D) 7 . 3 2 - 7 . 2 9 (m , 2 H) 7 . 2 5 - 7 .
 2 1 (m , 1 H) 7 . 1 7 - 7 . 1 4 (m , 2 H) 3 . 7 0 - 3 . 6 2 (m , 2 H) 3 .
 2 1 - 3 . 1 4 (m , 1 H) 3 . 0 9 - 3 . 0 5 (m , 1 H) 3 . 0 1 - 2 . 9 5 (m ,
 1 H) 2 . 5 7 - 2 . 5 2 (m , 1 H) 2 . 2 6 - 2 . 2 2 (m , 2 H) 2 . 1 8 - 2 .
 1 5 (m , 2 H) 1 . 7 5 - 1 . 6 4 (m , 2 H) 1 . 6 1 - 1 . 5 4 (m , 3 H) 1 .
 4 4 - 1 . 4 1 (m , 2 H) 1 . 3 9 - 1 . 3 6 (m , 1 H) 1 . 3 4 - 1 . 3 2 (m ,
 2 H) 。 M S - E S I 計算値 [M + H] ⁺ 3 5 3 , 実測値 3 5 3 。

10

20

【 0 0 4 6 】

実施例 4 : 化合物 I I I の結晶型 A クロリドイオン含有量試験

実験機器 :

イオンクロマトグラフィー I C S 5 0 0 0

クロマトグラフィーパラメータ :

保護カラム D i o n e x I o n P a c A G 1 1 - H C 、 4 x 5 0 m m g u a r d
c o l u m nクロマトグラフィーカラム D i o n e x I o n P a c A S 1 1 - H C 、 4 x 2 5 0
m m g u a r d c o l u m n

カラム温度 3 0

検出モード 導電率検出

流速 1 . 0 m L / m i n

A S R S - 4 m m 抑制器 1 8 m A

サンプル注入体積 2 5 μ L

解析時間 2 0 m i n

移動相 7 m M K O H

30

【 0 0 4 7 】

試料調製 :

3 つの 5 0 m g 化合物 I I I の結晶型 A 試料を正確的に量り、それぞれ試料 1 、試料 2
 、試料 3 として標識した。脱イオン水を溶解して定容し、0 . 2 m g / m L の 3 つの溶液
 を調製した。

40

実験結果 :

【 0 0 4 8 】

【 表 2 】

表 2 : 化合物 I I I の結晶型 A クロリドイオン含有量測定結果

クロリドイオン含有量 (%)		
計算値	実測値 (三次平均値)	誤差
1 6 . 7	1 7 . 0	0 . 3

50

【 0 0 4 9 】

実験結論：

化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａクロリドイオン含有量の実測値は、理論値と一致し、実測値と理論値との誤差が 0.3 % 未満であり、本試料は、2 つの塩酸塩を含有する。

【 0 0 5 0 】

実施例 5：化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａの吸湿性研究

実験材料：

S M S D V S A d v a n t a g e 動的蒸気吸着計

実験方法

化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａ 10 ～ 15 m g をとり、D V S 試料プレートに置いて測定を行った。

10

【 0 0 5 1 】

実験結果：

化合物ⅠⅠⅠの結晶型ＡのD V S パターンは、図 4 に示すように、 $W = 1.14\%$ であった。

【 0 0 5 2 】

実験結論：

化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａは、25 及び 80 % R H での吸湿による重量増加が 1.14 % であり、吸湿性ややありとされた。

20

【 0 0 5 3 】

実施例 6：化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａの固体安定性試験

「原薬及び製剤安定性試験指導原則」（中国薬局方 2015 版四部通則 9001）に準じて、化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａの高温（60℃，開口）高湿（室温 / 相対的湿度 92.5 %，開口）及び光照（合計照度 = $1.2 \times 10^6 \text{ Lux} \cdot \text{hr} / \text{m}^2$ ，近紫外 = $200 \text{ w} \cdot \text{hr} / \text{m}^2$ ，開口）条件での安定性を考察した。

【 0 0 5 4 】

それぞれ化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａを 10 m g 量り、ガラス試料瓶の底部に置いて、薄い一層となるように広げた。高温（60℃）及び高湿（相対的湿度 92.5 % R H）条件で放置された試料は、アルミホイルで瓶の口を封じ、試料が外気と十分に接触できるように、アルミホイルにいくつかの小穴を刺し開け、相応の定温定湿ケースに置いた。光照試料（開口，アルミホイルカバーなし）及び光照対照品（試料瓶ごとにアルミホイルによりカバーされたもの）を光照ケースに置いた。各時点でそれぞれ 2 つを量り、本測定の被験試料とした。別に、化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａを約 50 m g 量り、X R P D 測定に用いて、試料瓶をアルミホイルを包んで小穴を開けて、同様に相応の定温定湿ケースに置いた。試料を 5 日目、10 日目でサンプリング検出（X R P D）され、検出結果は、0 日目の初期検出結果と比較して、その試験結果は、以下の表 3 に示した。

30

【 0 0 5 5 】

【表 3】

表 3：化合物ⅠⅠⅠの結晶型Ａの固体安定性試験結果

試験条件	時点	晶型
—	0 日目	結晶型 A
高温（60℃，開口）	5 日目	結晶型 A
	10 日目	結晶型 A
高湿（相対的湿度 92.5 %，開口）	5 日目	結晶型 A
	10 日目	結晶型 A
光照（合計照度 = $1.2 \times 10^6 \text{ Lux} \cdot \text{hr} / \text{m}^2$ ，近紫外 = $200 \text{ w} \cdot \text{hr} / \text{m}^2$ ，開口）	5 日目	結晶型 A
	10 日目	結晶型 A

40

50

【 0 0 5 6 】

結論：化合物ⅠⅠⅠの結晶型Aは、高温、高湿、強い光照条件で良好な安定性を有した。

【 0 0 5 7 】

実施例7：化合物ⅠⅠⅠの結晶型Aの溶媒安定性試験

適量の化合物ⅠⅠⅠを量り、それぞれ異なるガラスバイアルに添加し、それぞれ適量の溶媒又は溶媒混合物を添加し、懸濁液となった。磁気ローターを添加し、室温に置いた後、上記の試料を定温ホモミキサー（40）に置いて2日間（遮光）震盪した。試料がなるべく懸濁となるように、実験過程中、試験現象によって化合物量及び溶媒量、引いて実験に用いた容器を交換した。（完全溶解の試料は自然的に揮発された）。試験結果は、以下の表4に示した。

10

【 0 0 5 8 】

【表4】

表4：化合物ⅠⅠⅠの結晶型Aの溶媒安定性試験結果

番号	溶媒	重量（mg）	溶媒体積（μL）	状態	晶型
1	アセトニトリル	32	300+200	懸濁液	結晶型A
2	テトラヒドロフラン	31	200+200	懸濁液	結晶型A
3	酢酸イソプロピル	30	200+400	懸濁液	結晶型A
4	イソプロパノール	31	200+200	懸濁液	結晶型A
5	メタノール	20	100	完全溶解後析出	結晶型A

20

【 0 0 5 9 】

結論：化合物ⅠⅠⅠの結晶型Aは、溶媒において良好な安定性を有した。

【 0 0 6 0 】

実験例1：化合物ⅠⅠⅠの結晶型AのLSD1に対する阻害作用研究

1.1 実験目的：

本実験の目的は、化合物ⅠⅠⅠの結晶型Aが10つの濃度でLSD1に対する阻害IC₅₀を評価することにある。二重複で、開始濃度10μM、3倍勾配希釈、異なる日付で二回繰り返した。

30

【 0 0 6 1 】

1.2 測定条件：

LSD1緩衝液成分：50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.05% CHAPS, 1% DMSO。

反応時間：室温で1時間反応した。

反応過程：

1.2.1 酵素を新鮮に製造された緩衝液に添加した。

40

【 0 0 6 2 】

1.2.2 ナノリットル級のAcoustic Technology (Echo 550, LabCyte Inc. Sunnyvale, CA)を使用して、化合物のDMSO溶液を酵素混合物に添加し、室温で30分間インキュベートした。

【 0 0 6 3 】

1.2.3 基質を新鮮に製造された緩衝液に添加した。

1.2.4 室温で1時間インキュベートした。

1.2.5 検出混合液を用意した。

【 0 0 6 4 】

1.2.6 Perkin Elmer Envisionでデータを読み取った。

50

1.2.7 Excel及びGraphPad Prismソフトでデータを解析した。

1.3 測定結果：

【0065】

【表5】

表5. 化合物IIIの結晶型AのLSD1に対する阻害作用

化合物	IC ₅₀ (nM) 平均値±標準偏差
化合物IIIの結晶型A	8.0±0.6

10

【0066】

結論：本実験は、酵素蛍光カブリング法で化合物IIIの結晶型AのLSD1に対する阻害作用を解析し、結果として、化合物IIIの結晶型AがLSD1に著しい阻害作用を有し、IC₅₀ = 8 nMであったことを示した。

【0067】

実験例2：化合物IIIの結晶型Aのヒト小細胞肺癌NCI-H1417細胞皮下異種移植腫瘍CB-17 SCIDマウスモデルに対する体内薬力学的研究

2.1 実験目的

本実験の目的は、本発明化合物IIIの結晶型Aのヒト小細胞肺癌NCI-H1417細胞皮下異種移植腫瘍に対するCB-17 SCIDマウスモデルでの体内薬力について

20

【0068】

2.2 実験動物：

種属：マウス

品系：CB-17 SCID マウス

週齢及び体重：6 - 8 週齢、体重：16 - 21 グラム

性別：メス

サプライヤー：上海靈暢生物科技有限公司

【0069】

2.3 実験方法及び工程

30

2.3.1 細胞培養

ヒト小細胞肺癌NCI-H1417細胞を体外で単層培養し、培養条件として、RPMI-1640培地に10%ウシ胎児血清を加えて、37℃、5%CO₂で継代培養した。細胞の飽和度が80% - 90%となると、パンクレアチン-EDTAで細胞を消化して回収し、カウントし、1.0 × 10⁷個細胞/mLとなるように調整して、PBSに再懸濁した。

【0070】

2.3.2 腫瘍細胞接種

0.2 mL (1.0 × 10⁶個) NCI-H1417細胞 (マトリックス添加、体積1:1) を皮下でそれぞれのマウスの右背中に接種し、腫瘍平均体積が約100 - 150 mm³となる際に投与群を分け始め、ランダムに群を分けて投与を開始した。

40

【0071】

2.3.3 被験物の調製

実験用溶媒が0.5%メチルセルロース溶液であり、5 gメチルセルロースを量り、800 mL超純水に溶解し、均一に攪拌した後に超純水で1000 mLまでに定容した。被験物を溶媒で溶解し、一定の濃度の均一な溶液を調製し、4℃で保存した。

【0072】

2.3.4 腫瘍測定及び実験指標

実験指標は、腫瘍の成長が阻害され、延滞され、又は治癒されるかを考察することである。週2回ノギスで腫瘍の直径を測定した。腫瘍体積の計算公式は、 $V = 0.5 a \times b^2$

50

であり、a及びbは、それぞれ腫瘍の長径及び短径を示した。

化合物の腫瘍阻害効力は、TGI(%)で示した。TGI(%)は、腫瘍成長の阻害率を反映した。TGI(%) = $\left[\left(1 - \left(\text{某処理群投与終了際の平均腫瘍体積} - \text{当該処理群開始投与際の平均腫瘍体積} \right) \right) / \left(\text{溶媒対照群治療終了際の平均腫瘍体積} - \text{溶媒対照群治療開始際の平均腫瘍体積} \right) \right] \times 100\%$ 。溶媒対照群：Vehicle(0.5%メチルセルロース溶液)。

【0073】

【表6】

表6：化合物IIIの結晶型Aのヒト小細胞肺癌NCI-H1417異種移植腫瘍モデルに対する腫瘍阻害効力評価
(投与後35日目の腫瘍体積に基づいて算出)

群別	腫瘍体積 (mm ³) (35日目)	TGI (%) (35日目)
Vehicle	443±41	—
化合物IIIの結晶型A (1mg/kg, PO, QD)	178±17	81.9
化合物IIIの結晶型A (1.5mg/kg, PO, QD)	121±15	99.2
化合物IIIの結晶型A (3mg/kg, PO, QD)	68±13	115.6

【0074】

結論：本発明化合物IIIの結晶型Aは、ヒト小細胞肺癌NCI-H1417異種移植腫瘍モデルに対して、優れた腫瘍阻害効果を有した。

10

20

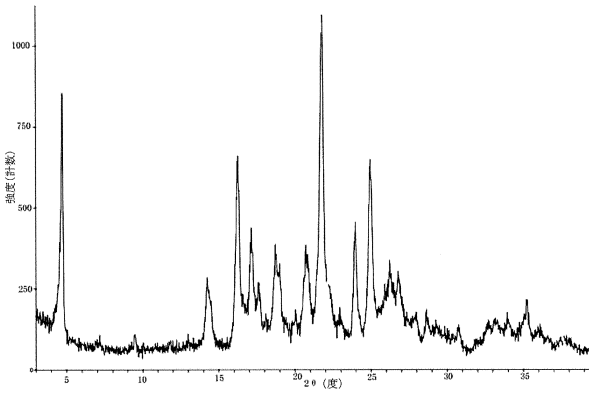
30

40

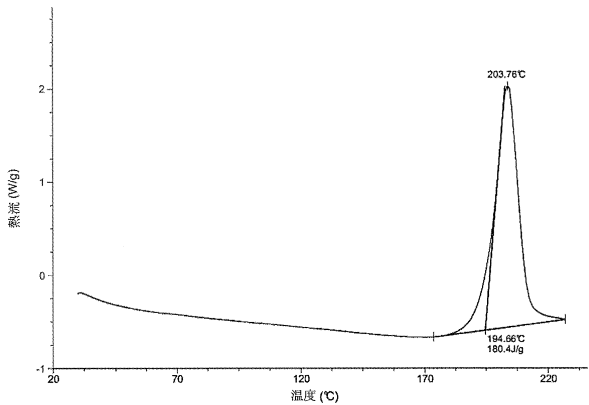
50

【図面】

【図 1】

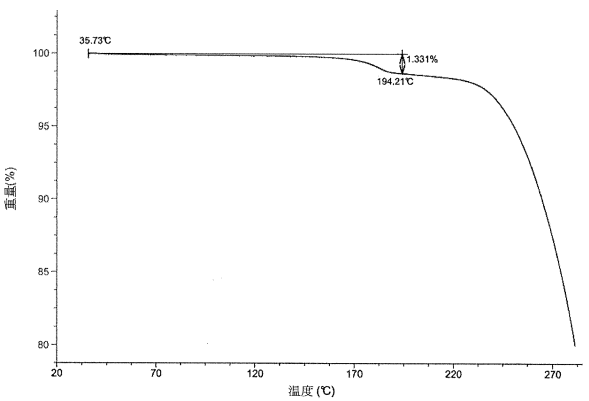


【図 2】

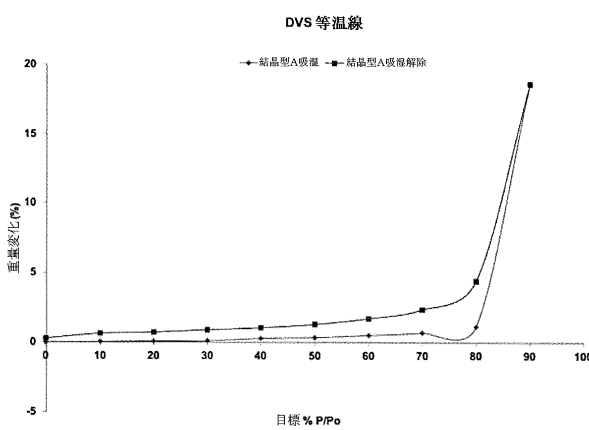


10

【図 3】



【図 4】



20

30

40

50

フロントページの続き

- (74)代理人 110001070
弁理士法人エスエス国際特許事務所
- (72)発明者 趙 楽 楽
中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 上海市浦 東 新区富特中路 2 8 8 号
- (72)発明者 孫 建 軍
中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 上海市浦 東 新区富特中路 2 8 8 号
- (72)発明者 吳 凌 雲
中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 上海市浦 東 新区富特中路 2 8 8 号
- (72)発明者 陳 曙 輝
中華人民共和国 2 0 0 1 3 1 上海市浦 東 新区富特中路 2 8 8 号
- 審査官 阿久津 江梨子
- (56)参考文献 特許第 7 2 1 7 7 1 2 (J P , B 2)
特表 2 0 1 3 - 5 3 5 4 6 0 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 4 1 6 0 (W O , A 1)
特表 2 0 1 4 - 5 1 5 0 1 3 (J P , A)
特表 2 0 1 3 - 5 2 5 3 3 1 (J P , A)
国際公開第 2 0 1 7 / 1 9 5 2 1 6 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 1 7 / 1 8 4 9 3 4 (W O , A 1)
- (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)
C 0 7 D
A 6 1 K
A 6 1 P
C A p l u s / R E G I S T R Y (S T N)