

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-525145
(P2024-525145A)

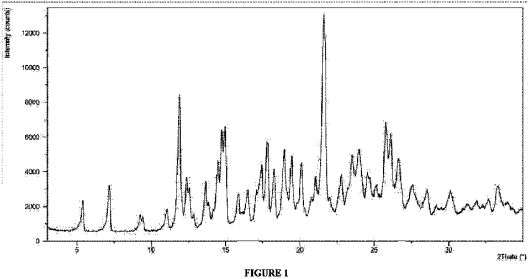
(43)公表日 令和6年7月10日(2024.7.10)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
C 0 7 D	487/10 (2006.01)	C 0 7 D	487/10	C S P 4 C 0 8 6
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	Z N A 4 H 0 0 6
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	31/53 (2006.01)	A 6 1 K	31/53	
C 0 7 C	235/60 (2006.01)	C 0 7 C	235/60	
		審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全73頁) 最終頁に続く		
(21)出願番号	特願2023-576415(P2023-576415)	(71)出願人	397060175	
(86)(22)出願日	令和4年6月16日(2022.6.16)		ヤンセン ファーマシューティカ エヌ.	
(85)翻訳文提出日	令和5年12月12日(2023.12.12)		ペー.	
(86)国際出願番号	PCT/CN2022/099089		ベルギー国 ペー. - 2 3 4 0	
(87)国際公開番号	WO2022/262796		トルンハウッサーヴェヒ 3 0	
(87)国際公開日	令和4年12月22日(2022.12.22)	(74)代理人	100092783	
(31)優先権主張番号	PCT/CN2021/100466		弁理士 小林 浩	
(32)優先日	令和3年6月17日(2021.6.17)	(74)代理人	100095360	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		弁理士 片山 英二	
(31)優先権主張番号	PCT/CN2022/091677	(74)代理人	100093676	
(32)優先日	令和4年5月9日(2022.5.9)		弁理士 小林 純子	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100120134	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA		弁理士 大森 規雄	
	最終頁に続く	(74)代理人	100194423	
			弁理士 植竹 友紀子	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 がんなどの疾患の治療のための (R) -N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-((2-メトキシエチル) (メチル) アミノ) -2-メチルヘキサン-3-イル) -2, 6-ジアザスピロ [3. 4] オクタン-6-イル) -1, 2, 4-トリアジン-6-イル) オキシ) ベンズアミドベシル酸塩及びその溶媒和物に関する。

(57)【要約】

本発明は、(R) -N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-((2-メトキシエチル) (メチル) アミノ) -2-メチルヘキサン-3-イル) -2, 6-ジアザスピロ [3. 4] オクタン-6-イル) -1, 2, 4-トリアジン-6-イル) オキシ) ベンズアミドベシル酸塩及びその溶媒和物に関する。この化合物は、哺乳動物における治療及び／又は予防、そのような化合物を含む医薬組成物、並びに、疾患、例えば、限定するものではないが白血病、骨髄異形成症候群 (MDS)、及び骨髄増殖性腫瘍 (MPN) などのがん及び糖尿病を治療するのに有用なメニン／MLタンパク質／タンパク質相互作用阻害剤としての使用に有用であり得る。

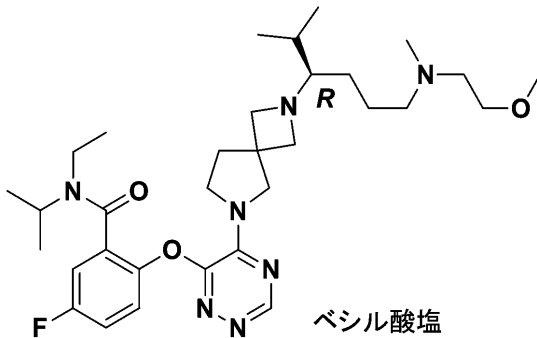


【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(R) - N - エチル - 5 - フルオロ - N - イソプロピル - 2 - ((5 - (2 - (6 - (2 - メトキシエチル) (メチル) アミノ) - 2 - メチルヘキサン - 3 - イル) - 2 , 6 - ジアザスピロ [3 . 4] オクタン - 6 - イル) - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - イル) オキシ) ベンズアミドベシル酸塩

【化 1】



又はその溶媒和物。

【請求項 2】

前記溶媒和物が水和物である、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 3】

前記化合物が、(R) - N - エチル - 5 - フルオロ - N - イソプロピル - 2 - ((5 - (2 - (6 - (2 - メトキシエチル) (メチル) アミノ) - 2 - メチルヘキサン - 3 - イル) - 2 , 6 - ジアザスピロ [3 . 4] オクタン - 6 - イル) - 1 , 2 , 4 - トリアジン - 6 - イル) オキシ) ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態 A であり、

前記結晶形態が、5 . 4、7 . 2、11 . 1、11 . 9、及び 21 . 7 度の 2 シータ ± 0 . 2 度の 2 シータにピークを含む X 線粉末回折パターンを生成する、請求項 1 に記載の化合物。

【請求項 4】

前記 X 線粉末回折パターンが、13 . 7、14 . 5、14 . 7、15 . 0、16 . 5、17 . 8、19 . 0、19 . 4、及び 20 . 1 度の 2 シータ ± 0 . 2 度の 2 シータから選択される少なくとも 1 つのピークを更に含み得る、請求項 3 に記載の結晶形態。

【請求項 5】

実質的に図 1 に示される X 線粉末回折パターンを更に特徴とする、請求項 3 又は請求項 4 に記載の結晶形態。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物と、医薬的に許容される担体、医薬的に許容される賦形剤、及び医薬的に許容される希釈剤のうちの少なくとも 1 つと、を含む、医薬組成物。

【請求項 7】

医薬的に許容される担体を、治療有効量の請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物と混合することを含む、請求項 6 に記載の医薬組成物を調製するプロセス。

【請求項 8】

医薬品として使用するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

がんの予防又は治療に使用するための、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

白血病、骨髓異形成症候群 (MDS) 及び骨髓増殖性腫瘍 (MPN) の予防又は治療に

10

20

30

40

50

使用するための、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の化合物、又は請求項 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 1】

前記白血病が（NPM1）変異型白血病である、白血病の予防又は治療に使用するための請求項 10 に記載の化合物又は医薬組成物。

【請求項 1 2】

がんが、白血病、リンパ腫、骨髄腫又は固形腫瘍がん、例えば、前立腺がん、肺がん、乳がん、膵臓がん、結腸がん、肝臓がん、黒色腫及び神経膠芽腫から選択される、請求項 9 に記載の使用のための化合物又は医薬組成物。

【請求項 1 3】

白血病の予防又は治療に使用するための請求項 10 に記載の化合物又は医薬組成物であって、前記白血病が、急性白血病、慢性白血病、骨髄球性白血病、骨髄性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、T細胞前リンパ球性白血病（T-PLL）、大顆粒リンパ球性白血病、有毛細胞白血病（HCL）、MLL再構成白血病、MLL-PTD白血病、MLL増幅白血病、MLL陽性白血病、及びHOX/MEIS1遺伝子発現シグネチャを示す白血病から選択される、化合物又は医薬組成物。

【請求項 1 4】

がんから選択される障害を治療又は予防する方法であって、治療有効量の請求項 1～5 のいずれか一項に記載の化合物又は請求項 6 に記載の医薬組成物を、治療又は予防を必要とする対象に投与することを含む、方法。

【請求項 1 5】

請求項 3～5 のいずれか一項に記載の結晶形態を調製するプロセスであって、化合物 A を再結晶する工程を含み、前記再結晶が、

a) 化合物 A 又はその水和物若しくは溶媒和物を、ベンゼンスルホン酸の存在下で、適切な溶媒の混合物に添加し、約 20℃から溶媒還流温度の範囲の温度に調整する工程と、

b) 結晶形態 A を播種する工程と、

c) 請求項 3～5 のいずれか一項に記載の結晶形態の沈殿物を得る工程とを含む、プロセス。

【請求項 1 6】

前記適切な溶媒の混合物が、アセトン、水及びIPAの混合物である、請求項 1 5 に記載のプロセス。

【請求項 1 7】

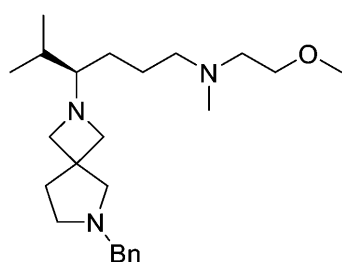
前記適切な溶媒の混合物が、イソプロパノール、水及びIPAの混合物である、請求項 1 5 に記載のプロセス。

【請求項 1 8】

前記温度が約 25℃である、請求項 1 5、請求項 1 6 又は請求項 1 7 に記載のプロセス。

【請求項 1 9】

【化 2】



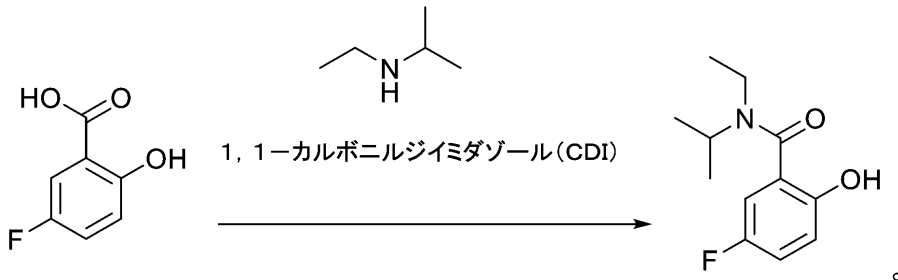
クエン酸塩の結晶形態であって、

5.82、10.09、及び18.42度の2シート±0.2度の2シートにピークを含むX線粉末回折パターンを生成する、結晶形態。

【請求項20】

適切な溶媒中、カップリング剤CDIの存在下で5-フルオロ-2-ヒドロキシ安息香酸を反応させることによる一段階反応によってN-エチル-5-フルオロ-2-ヒドロキシ-N-イソプロピルベンズアミドを提供する方法

【化3】



10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドベシル酸塩及びその溶媒和物に関する。

20

【0002】

この化合物は、哺乳動物における治療及び／又は予防、そのような化合物を含む医薬組成物、並びに、疾患、例えば、限定するものではないが白血病、骨髄異形成症候群(MDS)、及び骨髄増殖性腫瘍(MPN)などのがん及び糖尿病を治療するのに有用なメニン/MLLタンパク質/タンパク質相互作用阻害剤としての使用に有用であり得る。

【背景技術】

30

【0003】

混合系統白血病遺伝子(MLL、MLL1、KMT2A)に影響を及ぼす染色体再配列は、全ての年齢群にわたって侵襲性急性白血病をもたらす、依然として大部分が不治の疾患であり、新規な治療アプローチの緊急の必要性が力説されている。MLLのこれらの染色体転座を有する急性白血病は、リンパ性、骨髄性又は二表現型疾患として表れ、成人における急性白血病の5~10%及び乳児における約70%を構成する(Marschalek, Br J Haematol 2011, 152(2), 141-54, Tomizawa et al., Pediatr Blood Cancer 2007, 49(2), 127-32)。

【0004】

40

MLLは、リジン4(H3K4)上のヒストンH3をメチル化するヒストンメチルトランスフェラーゼであり、多タンパク質複合体において機能する。MLL1の誘導性機能喪失型対立遺伝子の使用は、MLL1が造血幹細胞(HSC)の維持及びB細胞の発生において必須の役割を果たすが、そのヒストンメチルトランスフェラーゼ活性は造血には必要ないことを実証した(Mishra et al., Cell Rep 2014, 7(4), 1239-47)。

【0005】

MLLと60を超える異なるパートナーとの融合が今日までに報告されており、白血病の形成/進行に関連付けられている(Meyer et al., Leukemia 2013, 27, 2165-2176)。興味深いことに、MLLのSET(Su(var

50

） 3-9、*zeste* のエンハンサー、及び *trithorax*）ドメインは、キメラタンパク質中に保持されないが、融合パートナーによって置換される（Thiel et al., Bioessays 2012. 34, 771-80）。融合パートナーによる Dot1L 及び／又は pTEFb 複合体のようなクロマチン修飾酵素の動員は、最も顕著なものとして HOXA 遺伝子（例えば、HOXA9）及び HOX 補因子 MEIS1 を含む MLL 標的遺伝子の転写及び転写伸長の増強をもたらす。次に、これらの遺伝子の異常な発現は、造血分化をブロックし、増殖を増進する。

【0006】

多発性内分泌腺腫症1型（MEN1）遺伝子によってコードされるメニンは、遍在的に発現され、主に核に局在する。これは、多数のタンパク質と相互作用することがわかっており、したがって、種々の細胞プロセスに関与する。メニンの最もよく理解されている機能は、MLL 融合タンパク質の発がん性補因子としてのその役割である。メニンは、全ての融合タンパク質に保持される MLL の N 末端断片内の 2 つのモチーフ、MBM1（メニン結合モチーフ1）及び MBM2 と相互作用する（Thiel et al., Bioessays 2012. 34, 771-80）。メニン／MLL 相互作用によって、水晶体上皮由来増殖因子（LEDGF）について新しい相互作用表面が形成される。MLL は LEDGF に直接結合するが、メニンは、MLL と LEDGF との間の安定な相互作用、及び LEDGF の PWWP ドメインを介した MLL 複合体の遺伝子特異的クロマチン動員に必須である（Cermakova et al., Cancer Res 2014. 15, 5139-51、Yokoyama & Cleary, Cancer Cell 2008. 8, 36-46）。更に、多くの遺伝学的研究は、メニンが MLL 融合タンパク質による発がん性形質転換に厳密に必要とされることを示しており、メニン／MLL 相互作用を魅力的な治療標的として示唆している。例えば、Men1 の条件付き欠失は、MLL 融合を異所的に発現する骨髓前駆細胞における白血球形成を防止する（Chen et al., Proc Natl Acad Sci 2006. 103, 1018-23）。同様に、機能喪失型突然変異によるメニン／MLL 融合相互作用の遺伝子破壊は、MLL 融合タンパク質の発がん特性を無効にし、白血病の発生をインビボでブロックし、MLL 形質転換白血病芽球の分化ブロックを解除する。これらの研究はまた、メニンが、MLL 融合タンパク質による HOX 遺伝子発現の維持に必要であることを示した（Yokoyama et al., Cell 2005. 123, 207-18）。更に、メニン／MLL 相互作用の小分子阻害剤が開発されており、このタンパク質／タンパク質相互作用のドラッグビリティを示唆しており、AML の前臨床モデルにおける有効性も実証されている（Borkin et al., Cancer Cell 2015. 27, 589-602、Cierpicki and Grembecka, Future Med Chem 2014. 6, 447-462）。メニンが正常な造血中の MLL1 の必須補因子ではないという観察結果（Li et al., Blood 2013. 122, 2039-2046）と共に、これらのデータは、MLL 再構成白血病及び活性 HOX／MEIS1 遺伝子シグネチャを有する他のがんの処置のための有望な新しい治療アプローチとして、メニン／MLL 相互作用を妨げることの正当性を立証する。例えば、MLL 遺伝子の 5' 領域内の内部タンデム重複（PTD）は、デノボ及び二次性 AML 並びに骨髓異形成症候群において主に見出される別の主要な異常を表す。MLL-PTD の分子機構及び生物学的機能は十分に理解されていないが、メニン／MLL 相互作用に影響を及ぼす新しい治療標的化戦略もまた、MLL-PTD 関連白血病の治療において有効であることが証明され得る。更に、去勢抵抗性前立腺がんは、メニン／MLL 相互作用に依存することがわかっている（Malik et al., Nat Med 2015. 21, 344-52）。

【0007】

MLL タンパク質は、科学分野においてヒストン-リジン N-メチルトランスフェラーゼ 2A（KMT2A）タンパク質としても知られている（UniProt アクセッション番号 Q03164）。

10

20

30

40

50

【0008】

いくつかの参考文献には、メニン-MLL相互作用を標的とする阻害剤が記載されている。国際公開第2011029054号、J Med Chem 2016, 59, 892-913には、チエノピリミジン及びベンゾジアゼピン誘導体の調製が記載されており、国際公開第2014164543号には、チエノピリミジン及びチエノピリジン誘導体が記載されており、Nature Chemical Biology March 2012, 8, 277-284及びRen, J. et al. Bioorg Med Chem Lett (2016), 26 (18), 4472-4476には、チエノピリミジン誘導体が記載されており、J Med Chem 2014, 57, 1543-1556には、ヒドロキシ及びアミノメチルペリジン誘導体が記載されており、Future Med Chem 2014, 6, 447-462には、小分子及びペプチド模倣化合物が概説されており、国際公開第2016195776号には、フロ[2, 3-d]ピリミジン、9H-プリン、[1, 3]オキサゾロ[5, 4-d]ピリミジン、[1, 3]オキサゾロ[4, 5-d]ピリミジン、[1, 3]チアゾロ[5, 4-d]ピリミジン、チエノ[2, 3-b]ピリジン及びチエノ[2, 3-d]ピリミジン誘導体が記載されており、国際公開第2016197027号には、5, 6, 7, 8-テトラヒドロピリド[3, 4-d]ピリミジン、5, 6, 7, 8-テトラヒドロピリド[4, 3-d]ピリミジン、ピリド[2, 3-d]ピリミジン及びキノリン誘導体が記載されており、国際公開第2016040330号には、チエノピリミジン及びチエノピリジン化合物が記載されている。国際公開第2017192543号には、メニン阻害剤としてペリジンが記載されている。国際公開第2017112768号、国際公開第2017207387号、国際公開第2017214367号、国際公開第2018053267号及び国際公開第2018024602号には、メニン-MLL相互作用の阻害剤が記載されている。国際公開第2017161002号及び国際公開第2017161028号には、メニン-MLLの阻害剤が記載されている。国際公開第2018050686号、国際公開第2018050684号及び国際公開第2018109088号には、メニン-MLL相互作用の阻害剤が記載されている。国際公開第2018226976号には、メニンとMLLタンパク質との相互作用を阻害するための方法及び組成物が記載されている。国際公開第2018175746号は、血液悪性腫瘍及びユーイング肉腫の治療方法を提供する。国際公開第2018106818号及び国際公開第2018106820号は、脾臓細胞の増殖を促進する方法を提供する。国際公開第2018153312号は、医薬品化学の分野に関するアザスピロ化合物を開示する。国際公開第2017132398号は、NPM1変異を示す白血病細胞を、MLLとメニンとの間の相互作用の薬理的阻害剤と接触させることを含む方法を開示する。国際公開第2019060365号には、メニン-MLLの置換阻害剤が記載されている。国際公開第2020069027号には、メニンの阻害剤による血液学的悪性腫瘍の治療が記載されている。Krivtsov et al., Cancer Cell 2019, No. 6 Vol. 36, 660-673には、メニン-MLL阻害剤が記載されている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2, 6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1, 2, 4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドベシル酸塩(ベンゼンスルホネート塩)：

【0010】

10

20

30

40

50

特に、本発明は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩2.0当量水和物に関する。

【0016】

より詳細には、本発明は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aに関する。

【0017】

より詳細には、本発明は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩0.5~2.0当量水和物の結晶形態Aに関する。

10

【0018】

より詳細には、本発明は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩2.0当量水和物の結晶形態Aに関する。

【0019】

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドのベシル酸塩又はその溶媒和物は、その化学的／物理的安定性、その物理的特性、及び安定な結晶性固体として単離できるという事実に関して優れている。

20

【0020】

本発明の一実施形態は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩又はその溶媒和物を含む医薬組成物に関する。

30

【0021】

本発明はまた、医薬的に許容される担体、医薬的に許容される賦形剤、及び／又は医薬的に許容される希釈剤並びに(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩又はその溶媒和物を含む医薬組成物、それらからなる医薬組成物、及び／又はそれらから本質的になる医薬組成物を提供する。

【0022】

また、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩又はその溶媒和物と、医薬的に許容される担体、医薬的に許容される賦形剤、及び／又は医薬的に許容される希釈剤を含む医薬組成物、それらからなる医薬組成物、及び／又はそれらから本質的になる医薬組成物の製造プロセスも提供される。

40

【0023】

本発明は更に、疾患、例えば、限定するものではないが、白血病、骨髓異形成症候群(MDS)、及び骨髓増殖性腫瘍(MPN)などのがん及び糖尿病を、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル

50

) (メチル) アミノ) - 2 - メチルヘキサン - 3 - イル) - 2, 6 - ジアザスピロ [3. 4] オクタン - 6 - イル) - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - イル) オキシ) ベンズアミドビスベシル酸塩及びその溶媒和物を使用して治療又は改善するための方法に関する。

【0024】

本発明はまた、医薬品の調製における、(R) - N - エチル - 5 - フルオロ - N - イソプロピル - 2 - ((5 - (2 - (6 - ((2 - メトキシエチル) (メチル) アミノ) - 2 - メチルヘキサン - 3 - イル) - 2, 6 - ジアザスピロ [3. 4] オクタン - 6 - イル) - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - イル) オキシ) ベンズアミドビスベシル酸塩又はその溶媒和物の使用であって、医薬品が、疾患、例えば、限定するものではないが、白血病、骨髓異形成症候群 (MDS)、及び骨髓増殖性腫瘍 (MPN) などのがん及び糖尿病を治療するために調製される、使用に関する。

10

【0025】

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、白血病、特にヌクレオフォスミン (NPM1) 変異型白血病、例えば、NPM1c の治療又は予防に有用であり得る。

【0026】

一実施形態では、本発明による化合物は、改善された代謝安定性特性を有し得る。

【0027】

一実施形態では、本発明による化合物は、延長されたインビボ半減期 ($T_{1/2}$) を有し得る。

【0028】

一実施形態では、本発明による化合物は、改善された経口バイオアベイラビリティを有し得る。

20

【0029】

一実施形態では、本発明による化合物は、腫瘍成長、例えば、MLL (KMT2A) 遺伝子の再構成 / 変化及び / 又は NPM1 変異を有する腫瘍を減少させ得る。

【0030】

一実施形態では、本発明による化合物は長期間にわたってインビボで改善されたPD特性、例えば、MEIS1などの標的遺伝子発現の阻害及び少なくとも16時間の期間にわたる分化マーカーの上方制御を有し得る。

【0031】

一実施形態では、本発明による化合物は、改善された安全性プロファイル (例えば、低減されたHERG阻害、改善された心血管安全性) を有し得る。

30

【0032】

一実施形態では、本発明による化合物は、Q. D. 投薬 (1日1回) に適切であり得る。

【0033】

本発明はまた、限定するものではないが、白血病、骨髓異形成症候群 (MDS)、及び骨髓増殖性腫瘍 (MPN) などのがん及び糖尿病の治療又は予防において使用するための、追加の医薬品と組み合わせた本発明による化合物の使用に関する。

【0034】

更に、本発明は、本発明による医薬組成物を調製するためのプロセスに関し、プロセスは、医薬的に許容される担体が、治療有効量の本発明による化合物と均質に混合されることを特徴とする。

40

【0035】

本発明はまた、限定するものではないが、白血病、骨髓異形成症候群 (MDS)、及び骨髓増殖性腫瘍 (MPN) などのがん及び糖尿病の治療又は予防において同時に、又は別々に、又は逐次的に使用するための組み合わせ製剤として、本発明による化合物とび追加の医薬品を含む製品に関する。

【0036】

更に、本発明は、温血動物における細胞増殖性疾患を治療又は予防する方法であって、

50

有効量の本明細書に定義される本発明による化合物、又は本明細書に定義される医薬組成物も若しくは組み合わせを上記動物に投与することを含む、方法に関する。

【0037】

他の実施形態では、本発明は、医薬品として使用するための、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドベシル酸塩及びその溶媒和物に関する。

【0038】

他の実施形態では、本発明は、医薬品として使用するための、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩及びその溶媒和物に関する。

10

【0039】

他の実施形態では、本発明は、医薬品として使用するための、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドベシル酸塩水和物の結晶形態Aに関する。

20

【0040】

他の実施形態では、本発明は、医薬品として使用するための、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aに関する。

【0041】

本発明はまた、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩及びその溶媒和物の調整に関する。

30

【0042】

本発明はまた、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aの調整に関する。

【図面の簡単な説明】

【0043】

発明の概要、並びに以下の発明を実施するための形態は、添付の図面と併せて読むことで、更に理解される。本発明を説明する目的で、図面には、本発明の例示的实施形態が示されている。しかしながら、本発明は、図面の特定の開示に限定されない。図面のうち：

40

【図1】(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態AのX線粉末回折(XRPD)パターンである。

【図2】Molm-14皮下(sc)モデルにおける有効性実験。

【図3】播種性OCI-AML3モデルにおける有効性実験。

【図4】中間体234bの粉末X線回折(XRPD)パターンである。

【発明を実施するための形態】

50

【0044】

本開示は、以下の用語集及び結論付ける実施例を含む、以下の説明を参照することによって、より完全に理解され得る。また、明確さのために本明細書では別々の態様の文脈で説明される、本開示の化合物、結晶形態 A、組成物及び方法の特定の特徴は、単一の態様において組み合わせて提供され得ることも理解される。逆に、簡潔さのために単一の態様の文脈で説明される、本開示の化合物、結晶形態 A、組成物及び方法の種々の特徴が、別々に又は任意の部分的組み合わせで提供される場合もある。

【0045】

本明細書で示されている量的表現の一部は、「約」という用語により修飾されていない。「約」という用語が明示的に使用されているか否かに関わらず、本明細書において示されている量は全て、その実際に示されている値を指すことを意味し、そのような示された値の実験及び／又は測定条件による近似値を含む、当該技術分野における通常の技量に基づいて合理的に推測されると思われる、そのような示された値の近似値を指すことも意味することが理解される。

10

【0046】

本明細書の説明及び特許請求の範囲を通して、「含む (comprise)」及び「含む (contain)」という用語並びにその変形、例えば「含む (comprising)」及び「含む (comprises)」は、「含むがこれに限定されない (including but not limited to)」を意味し、他の構成要素を排除することを意図しない (及び排除しない)。

20

【0047】

本開示において、「結晶形態」及び「多形」という用語は同義である。結晶形態の特徴情報が本明細書に提供される。特定の形態の決定は、当業者が特定の形態の存在を確立するのに十分であると認識する特徴情報の任意の部分を使用して達成することができることを理解されたい。例えば、たった 1 つの特徴的なピークであっても、特定の形態が存在することを当業者が認識するのに十分であり得る。

【0048】

「単離された形態」という用語は、別の化合物との任意の固体混合物、溶媒系又は生物学的環境から分離された形態で存在する化合物を指す。本発明の一実施形態では、結晶形態は単離形態で存在する。

30

【0049】

「室温」(RT)という用語は、約 15 °C ~ 約 30 °C、特に約 20 °C ~ 約 30 °C の温度を指す。好ましくは、室温は約 25 °C の温度である。

【0050】

結晶形態が、角度 2θ (2シータ) として与えられる 1 つ以上の XRPD ピークを使用して同定される場合、2θ 値のそれぞれは、別段の記載がない限り、所与の値 ± 0.2 度 2シータを意味すると理解される。

【0051】

「播種」という用語は、結晶化又は再結晶化を開始するための溶液又は混合物への結晶性材料の添加を指す。

40

【0052】

本明細書で使用される場合、「(本) 発明の化合物」又は「(本) 発明による化合物」という用語は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドベシル酸塩及びその溶媒和物、又はその任意のサブグループを含むことを意味する。

【0053】

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)

50

オキシ) ベンズアミドベシル酸塩は溶媒和物として存在し得る。「溶媒和物」は、水(すなわち、水和物)又は一般的な有機溶媒との溶媒和物であり得る。

【0054】

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドベシル酸塩又はその溶媒和物は、実質的に純粋な形態で得ることができ、単離された化合物中の不純物のモルパーセントは、約5モルパーセント未満、好ましくは約2モルパーセント未満、より好ましくは約0.5モルパーセント未満、最も好ましくは約0.1モルパーセント未満である。本発明の一実施形態では、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドベシル酸塩又はその溶媒和物が実質的に純粋な形態で存在する。

10

【0055】

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aは、実質的に純粋な形態で得ることができ、単離された結晶形態中の不純物のモルパーセントは、約5モルパーセント未満、好ましくは約2モルパーセント未満、より好ましくは約0.5モルパーセント未満、最も好ましくは約0.1モルパーセント未満である。本発明の一実施形態では、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物は、実質的に純粋な形態で存在する。

20

【0056】

本明細書では、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドの1つ以上の追加の形態(他の結晶形態、他の塩形態、又はそれらの溶媒和物など)との混合物としての(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aも提供される。少なくとも特定の重量パーセントは、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aであり得る。特定の重量パーセントとしては、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%及び99.9%が挙げられる。

30

40

【0057】

本明細書では、本明細書に記載の結晶形態を調製するプロセスであって、化合物Aを再結晶する工程を含み、再結晶が、

a) 化合物A又はその水和物若しくは溶媒和物を、ベンゼンスルホン酸の存在下で、適切な溶媒の混合物に添加し、約20℃から溶媒還流温度の範囲の温度に調整する工程と、

b) 結晶形態Aを播種する工程と、

c) 本明細書に記載の結晶形態の沈殿物を得る工程とを含む、方法が提供される。

【0058】

50

特に、前段落に記載したプロセスにおける適切な溶媒の混合物は、アセトン、水及びIPAの混合物である。

【0059】

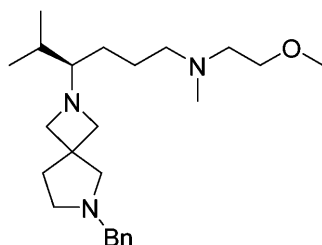
特に、前段落に記載したプロセスにおける適切な溶媒の混合物は、イソプロパノール、水及びIPAの混合物である。特に、本プロセスで使用される温度は約25℃である。

【0060】

また

【0061】

【化2】



10

クエン酸塩の結晶形態も提供され、

ここで、結晶形態は、5.82、10.09及び18.42度の2シータ±0.2度の2シータにピークを含むX線粉末回折パターンを生成し、具体的には、X線粉末回折パターンは、5.82、8.52、9.20、10.09、11.43、13.61、14.94、15.89、17.03及び18.42度の2シータ±0.2度の2シータにピークを含む。

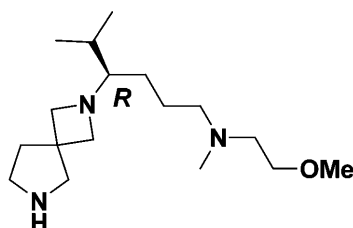
20

【0062】

また、以下の中間体：

【0063】

【化3】



30

がその医薬的に許容される塩又は溶媒和物として提供される。

【0064】

当業者は、「又はその溶媒和物」が、中間体の医薬的に許容される塩を指し、したがって医薬的に許容される塩の溶媒和物を包含することを理解するであろう。

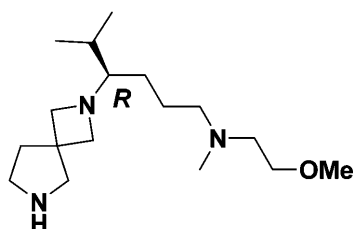
【0065】

また、以下の中間体：

40

【0066】

【化4】



が溶媒和物として提供される。

50

【0067】

医薬的に許容される塩としては、酸付加塩及び塩基付加塩が挙げられる。そのような塩は、従来の手段によって、例えば、遊離酸形態又は遊離塩基形態を、適切な塩基又は酸の1つ以上の等価物と、任意選択的に溶媒中で、又は塩が不溶性である媒体中で反応させ、続いて標準的な技術を使用して（例えば、真空中、凍結乾燥法によって、又は濾過によって）、当該溶媒又は当該媒体を除去することによって形成され得る。塩はまた、例えば、好適なイオン交換樹脂を使用して、塩の形態の本開示の化合物の対イオンを別の対イオンと交換することによって調製されてもよい。

【0068】

適切な酸は、例えば、ハロゲン化水素酸、例えば、塩酸若しくは臭化水素酸、硫酸、硝酸、リン酸などの酸などの無機酸、又は例えば、酢酸、プロパン酸、ヒドロキシ酢酸、乳酸、ピルビン酸、シュウ酸（すなわち、エタン二酸）、マロン酸、コハク酸（すなわち、ブタン二酸）、マレイン酸、フマル酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、メタンスルホン酸、エタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、シクラム酸、サリチル酸、p-アミノサリチル酸、パモン酸などの酸などの有機酸を含む。逆に、上記塩形態は、適切な塩基で処理することによって、遊離塩基形態に変換されることができる。

【0069】

適切な塩基塩形態は、例えば、アンモニウム塩、アルカリ及びアルカリ土類金属塩、例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、セシウム、マグネシウム、カルシウム塩など、有機塩基、例えば、一級、二級及び三級脂肪族アミン及び芳香族アミン、例えば、メチルアミン、エチルアミン、プロピルアミン、イソプロピルアミン、4つのブチルアミン異性体、ジメチルアミン、ジエチルアミン、ジエタノールアミン、ジプロピルアミン、ジイソプロピルアミン、ジ-n-ブチルアミン、ピロリジン、ピペリジン、モルホリン、トリメチルアミン、トリエチルアミン、トリプロピルアミン、キヌクリジン、ピリジン、キノリン、及びイソキノリンを有する塩、ベンズアチン、N-メチル-グルカミン、ヒドラバミン塩、及びアミノ酸、例えばアルギニン、リジンなどを有する塩を含む。逆に、塩基形態は、酸で処理することによって、遊離塩基形態に変換されることができる。

【0070】

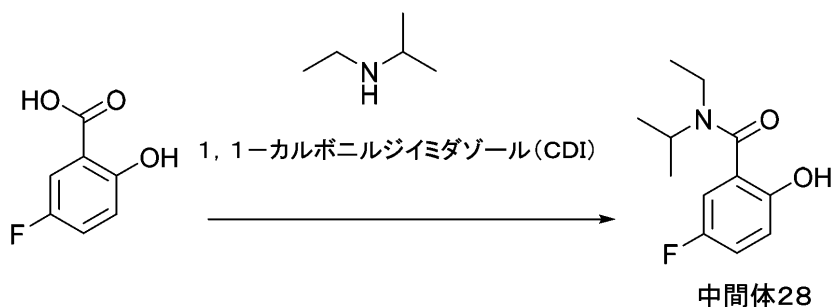
溶媒和物という用語は、溶媒付加形態を含む。そのような溶媒付加形態の例は、例えば、水和物、アルコールなどである。

【0071】

5-フルオロ-2-ヒドロキシ-安息香酸からN-エチル-5-フルオロ-2-ヒドロキシ-N-イソプロピルベンズアミド（中間体28）への一段階変換も提供される。

【0072】

【化5】



【0073】

この反応は、THF、トルエン、アセトニトリル又は2-メチルテトラヒドロフランなどの適切な溶媒中、カップリング剤CDIの存在下で行われる。特に、溶媒はTHFである。反応は、典型的には、0℃～還流温度、好ましくは0℃～50℃、より好ましくは10℃～30℃、更により好ましくは15℃～25℃の温度範囲で行われる。

【0074】

「医薬的に許容される」は、連邦政府若しくは州政府の規制当局又は米国以外の国の該当する当局により承認された、又は承認可能であること、あるいは動物における、より具体的にはヒトにおける使用について、米国薬局方又は他の一般的に認知されている薬局方に列挙されていることを意味する。

【0075】

「対象」という用語は、治療、観察、又は試験の対象となっている動物、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはヒトを指す。

【0076】

用語「治療有効量」は、本明細書で使用する時、研究者、獣医、医師、又は他の臨床医により求められている、治療されている疾患又は障害の症状の緩和若しくは逆転を含む、組織系、動物、又はヒト内で生体学的反応又は医薬反応を引き出す活性化合物又は医薬的薬剤の量を意味する。

10

【0077】

「組成物」という用語は、特定の成分を特定の量で含む製品、及び特定の量の特定の成分の組み合わせから直接的又は間接的に得られる任意の製品を包含することを意図する。

【0078】

本明細書で使用される場合、特に注記しない限り、「影響」又は「影響を受ける」という用語は（メニン／MLLタンパク質／タンパク質相互作用阻害剤の阻害によって影響を受ける疾患、症候群、状態、又は障害を指す場合）、上記疾患、症候群、状態、若しくは障害のうちの1つ以上の症状若しくは症状発現の頻度及び／若しくは重症度を減少させることを含み、並びに／又は上記疾患、症候群、状態、若しくは障害の1つ以上の症状若しくは症状発現の発症を予防することを含む。

20

【0079】

本明細書で使用される「治療」及び「治療すること」という用語は、障害の進行の減速、中断、停止若しくは停止、又はその1つ以上の症状の改善があり得る全てのプロセスを指すことを意図しているが、必ずしも全ての症状の完全な排除を示すものではない。

【0080】

実験パート

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aの合成

30

【0081】

40

50

【表 1 - 1】

表 1 : 略語

略語	意味
Ag(Phen) ₂ OTf	銀トリフレートビス(1, 10-フェナントロリン)錯体
2-MeTHF	2-メチルテトラヒドロフラン
ACN又はMeCN	アセトニトリル
AcCl	塩化アセチル
AcOH	酢酸
Ac ₂ O	無水酢酸
aq.	水性(aqueous)
Ar	アルゴン
BBr ₃	トリブロモラン
bn	ベンジル
Boc	tert-ブチルオキシカルボニル
Boc ₂ O	ジ-tert-ブチルジカーボネート
n-BuLi	n-ブチルリチウム
Cbz	ベンジルオキシカルボニル
CD ₃ OD	メタノール-d ₄
CHCl ₃	クロロホルム
Cs ₂ CO ₃	炭酸セシウム
conc.	濃縮/濃
DBU	1, 8-ジアザビシクロ[5. 4. 0]ウンデカ-7-エン
DCC	ジシクロヘキシルカルボジイミド
DCE	ジクロロエタン
DCM	ジクロロメタン
DDQ	4, 5-ジクロロ-3, 6-ジオキソシクロヘキサ-1, 4-ジエン-1, 2-ジカルボニトリル
DEA	ジエチルアミン
DIBAL-H	水素化ジイソブチルアルミニウム
DIEA又はDIPEA	N, N-ジイソプロピルエチルアミン
DMAP	N, N-ジメチルピリジン-4-アミン
DMF	N, N-ジメチルホルムアミド
DMP	Dess-Martinペルヨージナン
DMSO	ジメチルスルホキシド
dppf	1, 1'-フェロセンジイル-ビス(ジフェニルホスフィン)
EDCI	N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド 塩酸塩
EA又はEtOAc	酢酸エチル
EtOH	エタノール
eq.	当量
FA	ギ酸
FCC	フラッシュカラムクロマトグラフィ
h	時間
H ₂	水素
HATU	1-[ビス(ジメチルアミノ)メチレン]-1H-1, 2, 3-トリアゾロ[4, 5-b]ピリジニウム3-オキシドヘキサフルオロリン酸
H ₂ O	水
HCl	塩酸
HOBt	1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
HPLC	高速液体クロマトグラフィ
ICH ₂ Cl	クロロヨードメタン

10

20

30

40

【0082】

50

【表 1 - 2】

(表 1 の続き)

略語	意味
IPA	イソプロピルアルコール
IPAc	酢酸イソプロピル
K_2CO_3	炭酸カリウム
KI	ヨウ化カリウム
K_2HPO_4	リン酸カリウム
K_3PO_4	リン酸三カリウム
$LiAlD_4$	重水素化アルミニウムリチウム
LAH	水素化アルミニウムリチウム
$LiBH_4$	水素化ホウ素リチウム
LDA	リチウムジイソプロピルアミド
LiCl	塩化リチウム
LG	脱離基
Me	メチル
MeOH	メタノール
2-MeTHF	2-メチルテトラヒドロフラン
min	分
mL	ミリリットル
mmol	ミリモル
mg	ミリグラム
$MgSO_4$	硫酸マグネシウム
MSA	メタンスルホン酸
MsCl	メタンスルホニルクロリド
MS	モレキュラーシーブ
MTBE	メチルtert-ブチルエーテル
N_2	窒素
NA	該当なし
$NaBH_3CN$	シアノ水素化ホウ素ナトリウム
$NaBH(OAc)_3$	トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム
$NaBD_3CN$	シアノ重水素化ホウ素ナトリウム
Na_2CO_3	炭酸ナトリウム
NaH	水素化ナトリウム
$NaHCO_3$	重炭酸ナトリウム
NaI	ヨウ化ナトリウム
NaOAc	酢酸ナトリウム
NaOH	水酸化ナトリウム
Na_2SO_3	亜硫酸ナトリウム
Na_2SO_4	硫酸ナトリウム
NH_4Cl	塩化アンモニウム
NMM	1-4-メチルモルホリン
Pd_2dba_3	トリス(ジベンジリデンアセトン)ジパラジウム(0)
$Pd(dppf)Cl_2 \times DCM$	[1, 1'-ビス(ジフェニルホスフィン)フェロセン]ジクロロパラジウム(II)、ジクロロメタンとの錯体
$Pd(PPh_3)_4$	テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0)
PE	石油エーテル
PG	保護基
Phen	フェナントロリン
psi	平方インチ当たりのポンド

10

20

30

40

【0083】

50

【表 1 - 3】

(表 1 の続き)

略語	意味
p-TsOH	p-トルエンスルホン酸
p-TsOH × H ₂ O	p-トルエンスルホン酸一水和物
R _t	保持時間
ロッシェル塩	酒石酸ナトリウムカリウム四水和物
RT	室温
sat.	飽和
SFC	超臨界流体クロマトグラフィ
TBAF	フッ化テトラブチルアンモニウム
TBDMS	tert-ブチルジメチルシリル
TBDPS	tert-ブチルジメチルシリル
t-BuOK	カリウムtert-ブトキシド
TEA	トリエチルアミン
Tf	トリフルオロメタンスルホニル
TFA	トリフルオロ酢酸
THF	テトラヒドロフラン
Ti(OiPr) ₄	チタン(IV)イソプロポキシド
TLC	薄層クロマトグラフィ
TMEDA	N, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン
TMG	1, 1, 3, 3-テトラメチルグアニジン
TMSI	ヨードトリメチルシラン
Ts	p-トルエンスルホニル
TsCl	p-トルエンスルホニルクロリド
v/v	体積/体積
vol.	体積
wt	重量
キサントホス	4, 5-ビス(ジフェニルホスフィノ)-9, 9-ジメチルキサンテン

10

20

【0084】

当業者は、以下の実験プロトコルに明示的に言及されていない場合であっても、典型的にはカラムクロマトグラフィ精製後に、所望の画分を収集し、溶媒を蒸発させたことを理解するであろう。

【0085】

立体化学が示されていない場合、これは、特に示されていないか、又は文脈から明らかでない限り、立体異性体の混合物であることを意味する。

【0086】

立体中心が「RS」で示される場合、これは、別途記載のない限り、示された中心でラセミ混合物が得られたことを意味する。

【0087】

当業者によって理解されるように、示されるプロトコルを使用して合成された化合物及び中間体は、溶媒和物、例えば、水和物として存在し得、かつ/又は残留溶媒若しくは微量不純物を含むし得る。塩の形態又は溶媒和物（例えば、水和物）で単離された化合物又は中間体は、整数化学量論、すなわち、単塩若しくは二塩、又は中間化学量論のものであり得る。中間体又は化合物が、HClの当量数を示さずに「HCl塩」として示される場合、これは、HClの当量数を確認しなかったことを意味する。中間体又は化合物が、H₂Oの当量数を示さずに「水和物」として示される場合、これは、H₂Oの当量数を確認しなかったことを意味する。

【0088】

便宜上、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-

30

40

50

(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミド(遊離塩基)は、以下の実験パートにおいて「化合物A」として示される。

【0089】

実施例1-(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-(5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミド(化合物A)の合成-調製方法A

中間体1の調製

tert-ブチル(5-メチル-4-オキソヘキシル)カルバメート

【0090】

【化6】



【0091】

-70℃に冷却したTHF(60mL)に、tert-ブチル2-オキソピロリジン-1-カルボキシレート(5.0g、27mmol)及びTMEDA(5.0mL、33mmol)を溶解した溶液に、イソプロピルマグネシウムブロミド溶液(19mL、55mmol、2-メチルテトラヒドロフラン中2.9M)をゆっくり添加し、得られた混合物をゆっくりと室温に加温し、12時間攪拌した。混合物を飽和NH₄Cl水溶液(50mL)に注ぎ、EtOAc(50mL×3)で抽出した。合わせた有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して粗生成物を得、これをFCC(PE/EtOAc=1:0~100:1)によって更に精製して、標題中間体(3.7g、収率60%)を黄色油として得た。

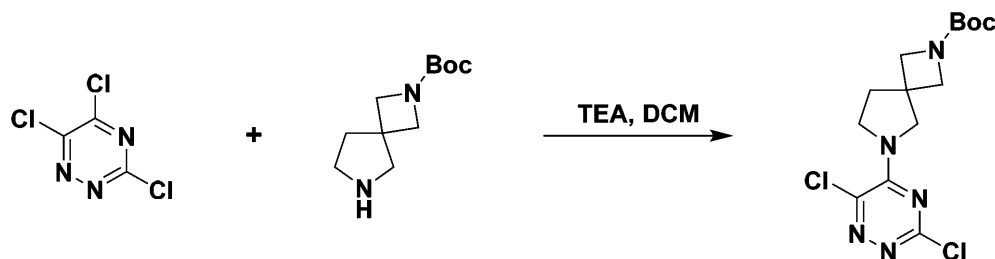
【0092】

中間体13の調製

tert-ブチル6-(3,6-ジクロロ-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-カルボキシレート

【0093】

【化7】



【0094】

0℃に冷却したDCM(100mL)に、3,5,6-トリクロロ-1,2,4-トリアジン(10.0g、54.2mmol)及びTEA(15.2mL、109mmol)を溶解した溶液に、tert-ブチル2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-カルボキシレート(9.21g、43.4mmol)を添加し、混合物を室温に加温し、1時間攪拌した。混合物を水(20mL)で希釈し、DCM(30mL×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、減圧下で濃縮して粗生成物を得、これをシリカゲルFCC(PE/EtOAc=1:0~3:1)により精製して、標題中間体(12.0g、収率58%)を黄色固体として得た。

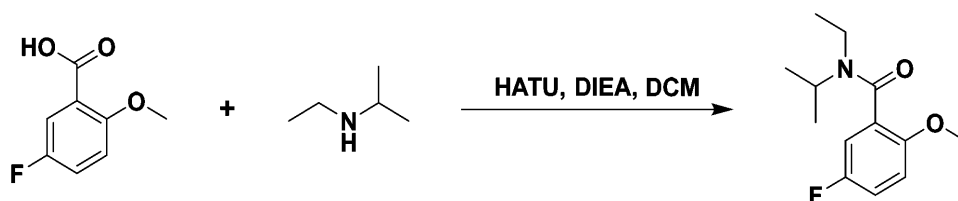
【0095】

中間体27の調製

N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-メトキシベンズアミド

【0096】

【化8】



10

【0097】

0℃に冷却した乾燥DCM(150mL)に、5-フルオロ-2-メトキシ安息香酸(8.00g、47.0mmol)及びN-エチルプロパン-2-アミン(8.19g、94.0mmol)を混合した混合物に、HATU(21.5g、56.5mmol)及びDIEA(9.10g、70.4mmol)を小分けにしてゆっくり添加した。得られた混合物をゆっくりと室温に温め、8時間攪拌した。有機層を水(20mL×3)で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥させた。濾過後、溶媒を減圧下で除去し、粗生成物をFCC(EtOAc/PE=0%~20%)により精製して、標題中間体(12.0g、収率96%)を白色固体として得た。

20

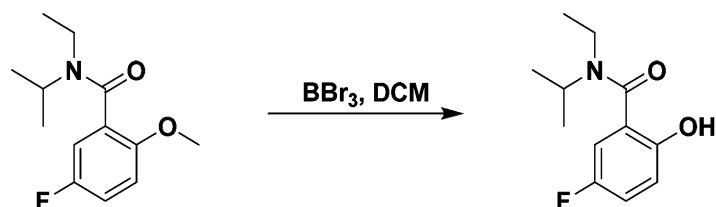
【0098】

中間体28の調製

N-エチル-5-フルオロ-2-ヒドロキシ-N-イソプロピルベンズアミド

【0099】

【化9】



30

【0100】

-78℃に冷却した乾燥DCM(100mL)に、N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-メトキシベンズアミド(中間体27)(12.0g、50.1mmol)を溶解した溶液に、BBr₃(14.4mL、152mmol)をゆっくり添加し、得られた混合物を室温にゆっくり加温し、8時間攪拌した。混合物を再び-78℃に冷却し、MeOH(5mL)を滴加して反応をクエンチした。得られた混合物をゆっくり室温に加温し、飽和NaHCO₃水溶液を添加することによってpH値を約8に調整した。水層をDCM(50mL×3)で抽出し、合わせた有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して粗生成物を得て、これをFCC(EtOAc/PE=0%~20%)により精製して、標題中間体(9.0g、収率78%)を白色固体として得た。

40

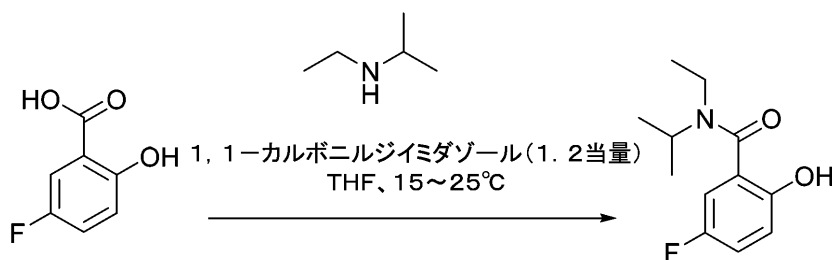
【0101】

中間体28の代替調製

【0102】

50

【化 10】



【0103】

THF (168 L、12 体積) に 5-フルオロ-2-ヒドロキシ安息香酸 (14.0 kg、89.68 mol、1.0 当量) を混合した混合物を 15~25℃ に調整し、1,1-カルボニルジイミダゾール (17.45 kg、107.62 mol、1.2 当量) を 1 時間かけて添加した。添加後、混合物を 15~25℃ で 18 時間攪拌した。この時間を経た後、N-エチルプロパン-2-アミン (14.85 kg、170.39 mol、1.9 当量) を混合物に 15~25℃ で 2 時間かけて添加した。得られた混合物を 15~25℃ で 18~24 時間にわたって更にエージングした。10% H₂SO₄ 水溶液 (140 kg、10 体積) を用いて pH を pH 4~5 に調整し、層を分離した。温度を 40℃ 未満に維持しながら有機相を 42~56 L に濃縮し、次いで、n-ヘプタン (43 kg、4.5 体積) を混合物に 15~25℃ で 3 時間にわたって添加した。次いで、混合物を 0~10℃ に冷却し、更に 6 時間攪拌した。得られたスラリーを濾過し、ケーキを tert-ブチルメチルエーテル (MTBE) : n-ヘプタン混合物 (2.5 体積) で洗浄した。ケーキ洗浄を更に 2 回繰り返し、得られた固体を真空中 50℃ で乾燥させて、中間体 28 (16.5 kg、純度: 99.1%、収率: 80.4%) を得た。

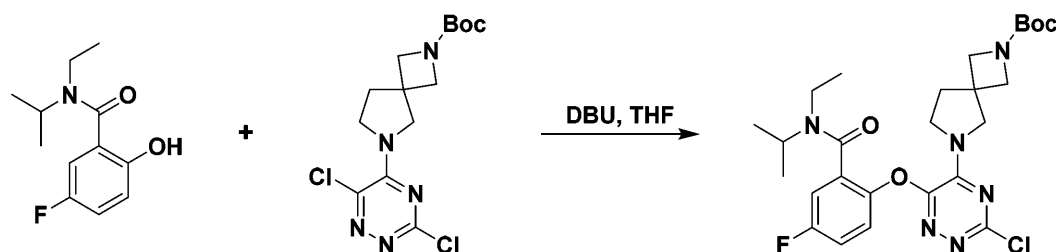
【0104】

中間体 14 の調製

tert-ブチル 6-(3-クロロ-6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-カルボキシレート

【0105】

【化 11】



【0106】

THF (120 mL) に、tert-ブチル 6-(3,6-ジクロロ-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-カルボキシレート (中間体 13) (12.0 g、33.3 mmol)、N-エチル-5-フルオロ-2-ヒドロキシ-N-イソプロピルベンズアミド (中間体 28) (7.5 g、33.3 mmol) 及び DBU (6.1 g、40.1 mmol) を混合した混合物を 25℃ で 8 時間攪拌した。混合物を水 (30 mL) で希釈し、DCM (30 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、減圧下で濃縮して粗生成物を得、これを FCC (PE/EtOAc = 1:0~3:1) により精製して、標題中間体 (14.0 g、収率 73%) を緑色固体として得た。

【0107】

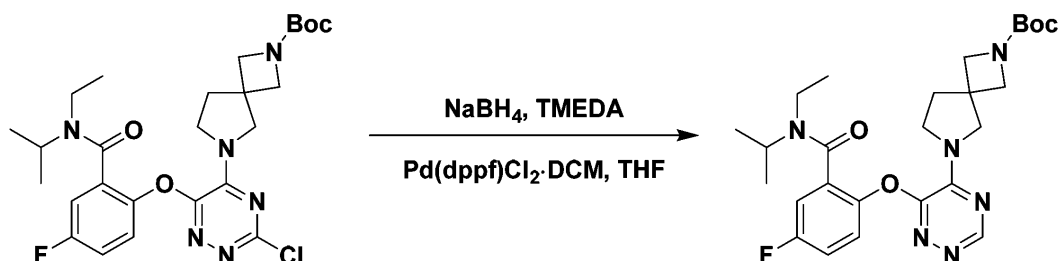
中間体2の調製

tert-ブチル6-(6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-カルボキシレート

中間体2の合成方法A

【0108】

【化12】



10

【0109】

THF (500 mL) に、tert-ブチル6-(3-クロロ-6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-カルボキシレート (中間体14) (20 g、36.4 mmol)、NaBH₄ (2.48 g、65.7 mmol) 及び TMEDA (8.54 g、73.5 mmol) を混合した混合物に、Pd(dppf)Cl₂ × DCM (1.70 g、2.08 mmol) を N₂ 雰囲気下で添加した。添加後、反応混合物を 25℃ で 14 時間撹拌した。反応混合物を濾過し、濾液を濃縮し、残留物をシリカゲル FCC (EtOAc) により精製して、標題中間体 (15 g、純度 93%、収率 74%) を褐色固体として得た。

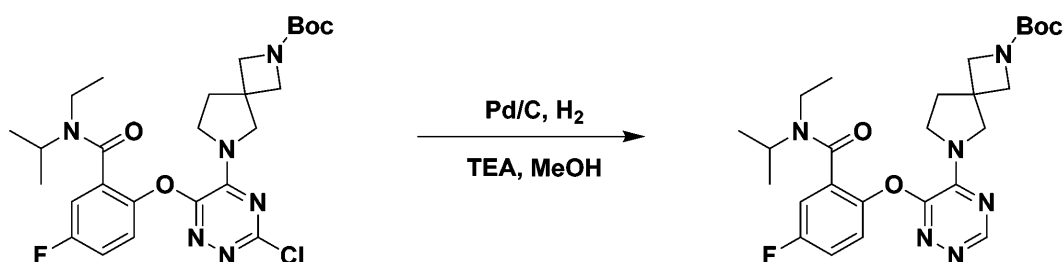
20

【0110】

中間体2の合成方法B

【0111】

【化13】



30

【0112】

MeOH (100 mL) に、tert-ブチル6-(3-クロロ-6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-カルボキシレート (中間体14) (22.0 g、40.1 mmol)、TEA (15 mL) を溶解した溶液に、Pd/C (湿潤、5.0 g、10%) を添加した。得られた混合物を H₂ 雰囲気下 (30 psi)、25℃ で 8 時間撹拌した。反応混合物を celite パッドを通して濾過し、濾液を真空中で濃縮して、標題中間体 (25.0 g、粗製) を得、これを更に精製することなく次工程で直接使用した。

40

【0113】

中間体3の調製

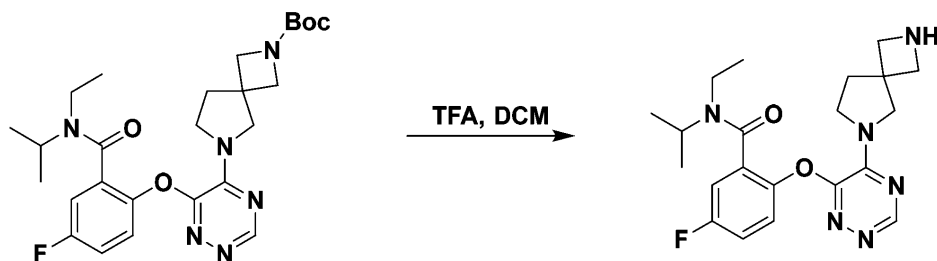
2-((5-(2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-ト

50

リアジン-6-イル)オキシ)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピルベンズアミド

【0114】

【化14】



10

【0115】

DCM (5 mL) に、tert-ブチル 6-(6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-カルボキシレート (中間体 2) (300 mg、0.583 mmol) を溶解した溶液に、TFA (0.5 mL、6.4 mmol) を添加し、得られた混合物を室温で 3 時間攪拌した。次いで、10% NaOH (5 mL) 溶液を混合物にゆっくり添加して pH 値を約 12 に調整し、得られた混合物を DCM (10 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮して、標題中間体 (220 mg、収率 90%) を白色固体として得た。

20

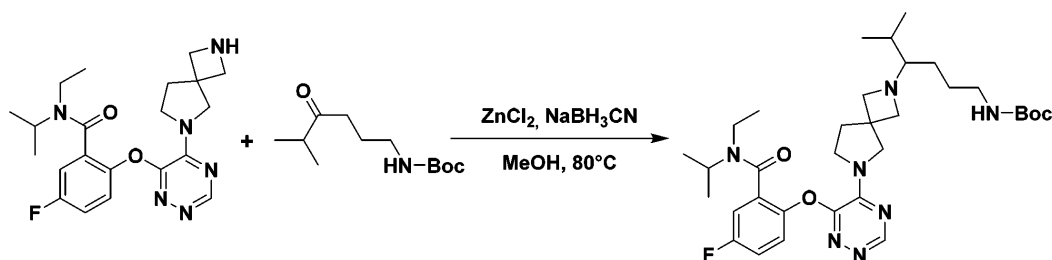
【0116】

化合物 61 の調製

tert-ブチル (4-(6-(6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-5-メチルヘキシル)カルバメート

【0117】

【化15】



30

【0118】

MeOH (15 mL) に、2-(5-(2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピルベンズアミド (中間体 3) (1.0 g、2.4 mmol)、tert-ブチル (5-メチル-4-オキソヘキシル)カルバメート (中間体 1) (830 mg、3.62 mmol) 及び ZnCl₂ (660 mg、4.84 mmol) を混合した混合物を 80°C で 0.5 時間攪拌した。次いで、NaBH₃CN (310 mg、4.93 mmol) を添加し、得られた混合物を 80°C で 6 時間攪拌した。室温に冷却した後、混合物を減圧下で濃縮して粗生成物を得、これを Waters Xbridge Prep OBD を用いた分取 HPLC (カラム: C18 150 × 40 mm 10 μm、溶離液: ACN / H₂O (0.05% アンモニア) 45% ~ 75% v/v) により更に精製して、標題化合物 (700 mg、収率 46%) を無色油状物として得た。

40

【0119】

化合物 62 及び 63 の調製

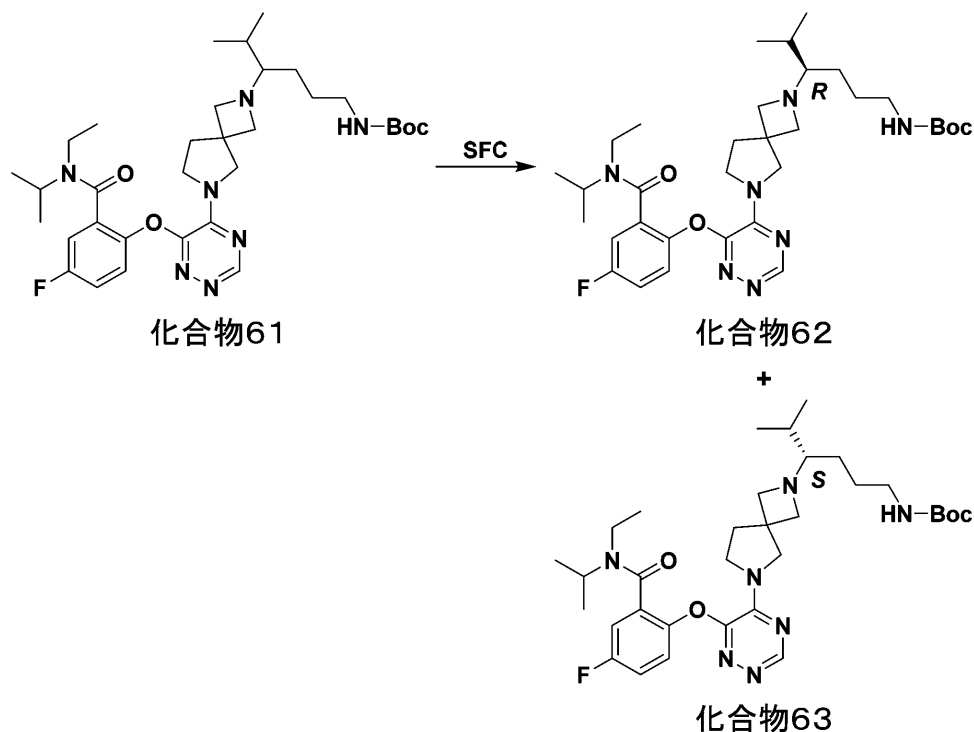
50

tert-ブチル(R)-(4-(6-(6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-5-メチルヘキシル)カルバメート

tert-ブチル(S)-(4-(6-(6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-5-メチルヘキシル)カルバメート

【0120】

【化16】



10

20

【0121】

tert-ブチル(4-(6-(6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-5-メチルヘキシル)カルバマート(化合物61)(200mg、0.319mmol)を、DAICEL CHIRALPAK IG(カラム:250×30mm10μm、定組成溶離:EtOH(0.1%の25%アンモニアを含む):超臨界CO₂、40%:60%(v/v))を用いたSFCにより精製して、標題化合物(化合物62)(85mg、収率42%)及び(化合物63)(80mg、収率40%)をいずれも淡黄色油状物として得た。

30

【0122】

化合物64

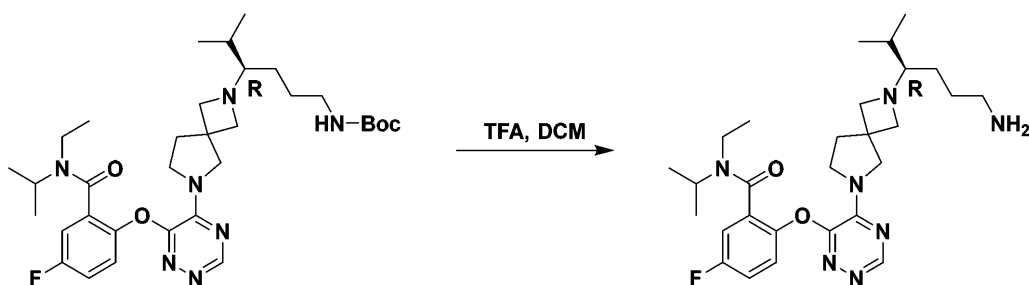
(R)-2-((5-(2-(6-アミノ-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピルベンズアミド

40

【0123】

50

【化 17】



10

【0124】

DCM (4 mL) に、tert-ブチル (R) - (4 - (6 - (6 - (2 - (エチル (イソプロピル) カルバモイル) - 4 - フルオロフェノキシ) - 1, 2, 4 トリアジン - 5 - イル) - 2, 6 - ジアザスピロ [3. 4] オクタン - 2 - イル) - 5 - メチルヘキシル) カルバメート (化合物 62) (550 mg、0.876 mmol) を溶解した溶液に、TFA (4 mL) をゆっくり添加し、得られた混合物を 25 °C で 1 時間攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮して残渣を得た。残渣を DCM (40 mL) で希釈し、pH 値を NaOH 水溶液 (2 M、16 mL) を用いて約 12 に調整した。水層を DCM で抽出した (100 mL × 2)。合わせた有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、真空中で濃縮して、標題化合物 (460 mg、粗製) を黄色固体として得、これを更に精製することなく次工程で直接使用した。

20

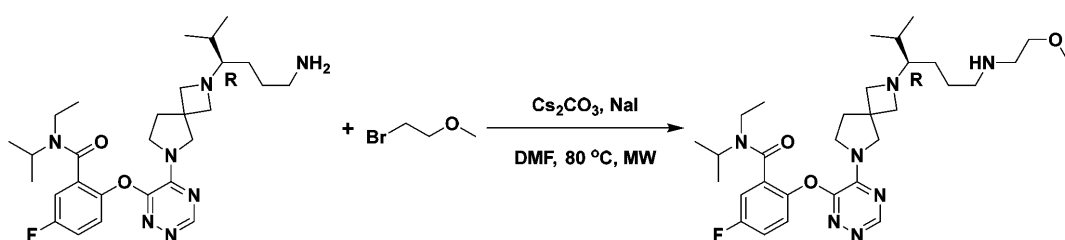
【0125】

化合物 11

(R) - N - エチル - 5 - フルオロ - N - イソプロピル - 2 - ((5 - (2 - (6 - (2 - メトキシエチル) アミノ) - 2 - メチルヘキサン - 3 - イル) - 2, 6 - ジアザスピロ [3. 4] オクタン - 6 - イル) - 1, 2, 4 トリアジン - 6 - イル) オキシ) ベンズアミド

【0126】

【化 18】



30

【0127】

DMF (1 mL) に、(R) - 2 - ((5 - (2 - (6 - アミノ - 2 - メチルヘキサン - 3 - イル) - 2, 6 - ジアザスピロ [3. 4] オクタン - 6 - イル) - 1, 2, 4 トリアジン - 6 - イル) オキシ) - N - エチル - 5 - フルオロ - N - イソプロピルベンズアミド (化合物 64) (120 mg、粗製)、1 - ブロモ - 2 - メトキシエタン (32 mg、0.23 mmol)、Cs₂CO₃ (222 mg、0.681 mmol)、NaI (102 mg、0.680 mmol) を混合した混合物を、マイクロ波照射によって 80 °C で 1 時間攪拌した。室温に冷却した後、混合物を H₂O (10 mL) で希釈し、EtOAc (3 × 10 mL) で抽出した。合わせた有機層を H₂O (10 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で脱水し、濾過し、減圧下に濃縮して粗生成物を得、それを更に、Phenomenex Gemini-NX (カラム：150 × 30 mm 5 μm、溶離液：ACN / H₂O (10 mM NH₄HCO₃) 51% ~ 71% (v / v)) を用いた HPLC により精製し、更に、DAICEL CHIRALCEL OD-H (カラム：250 × 30 mm 5 μm、溶出液：EtOH 中の超臨界 CO₂ (0.1% v / v アンモニア) 25 / 25、v /

40

50

v) を用いた SFC により精製して、標題化合物 (5.13 mg、純度 96%) を黄色固体として得た。

【0128】

LC-MS (ESI) (方法 1) : $R_t = 2.997$ 分、 m/z 実測値 586.3 [M + H]⁺。

【0129】

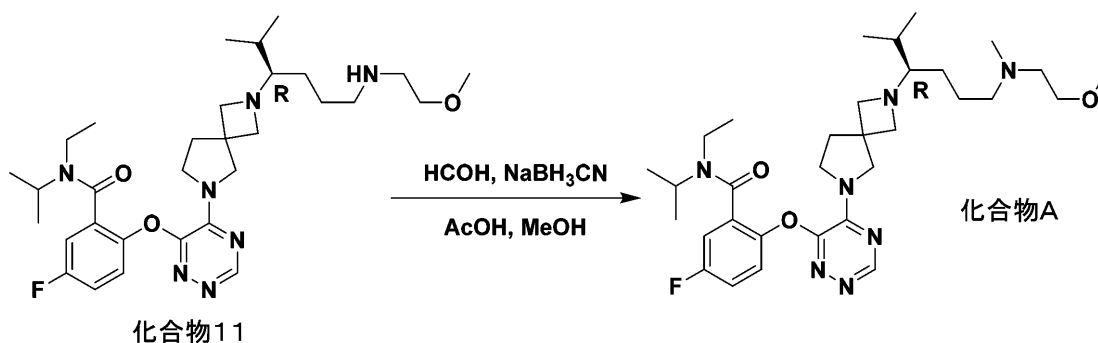
化合物 A

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミド

10

【0130】

【化19】



20

【0131】

無水 MeOH (2 mL) に、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミド (化合物 11) (40.0 mg、0.068 mmol)、ホルムアルデヒド (55.4 mg、0.683 mmol、水中 37%) 及び AcOH (8.2 mg、0.137 mmol) を混合した混合物を、45℃で1時間攪拌した。次いで、NaBH₃CN (8.6 mg、0.137 mmol) を混合物に添加し、得られた混合物を 45℃で更に1時間攪拌した。室温に冷却した後、反応混合物を飽和 NaHCO₃ 水溶液 (40 mL) で希釈して、pH 値を約 8 に調整し、更に DCM (20 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層を無水 Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して粗生成物を得、これを Boston Prime (カラム: C18 150 × 30 mm 5 μm、移動相 A: H₂O (0.04% アンモニア + 10 mM NH₄HCO₃)、移動相 B: ACN、流速: 25 mL/分、50% ~ 80% (50% B ~ 80% B) の勾配条件 B/A) を用いた分取 HPLC により精製して、標題化合物 (9.62 mg、純度 99.10%、収率 23.3%) を黄色油状物として得た。

30

【0132】

実施例 2 - (R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミド (化合物 A) の合成 - 調製方法 B

40

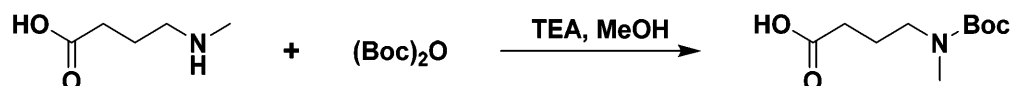
中間体 7 の調製

4-((tert-ブトキシカルボニル)(メチル)アミノ)ブタン酸

【0133】

50

【化20】



【0134】

MeOH (30 mL) に、4-(メチルアミノ)ブタン酸塩酸塩 (3.0 g、19.5 mmol) 及び TEA (7.78 mL、58.6 mmol) を溶解した溶液に、Boc₂O (4.69 g、21.5 mmol) を滴下した。混合物を室温で2時間攪拌した。混合物を減圧下で濃縮し、残渣を EtOAc (100 mL) で希釈し、冷却した 0.1 N HCl (70 mL × 2)、H₂O (50 mL × 2) 及びブライン (50 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮して、標題中間体 (1.80 g、粗製) を無色油状物として得た。

10

【0135】

中間体8の調製

tert-ブチル (4-(メトキシ(メチル)アミノ)-4-オキソブチル) (メチル) カルバメート

【0136】

【化21】



20

【0137】

CHCl₃ (30 mL) に、4-(tert-ブトキシカルボニル) (メチル) アミノ)ブタン酸 (中間体7) (1.80 g、粗製) を溶解した溶液に、N,O-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸塩 (960 mg、9.84 mmol)、HOBT (1.24 g、9.18 mmol) 及び NMM (2.80 mL、25.1 mmol) を添加した。次いで、EDCI (2.23 g、11.6 mmol) を添加し、反応混合物を室温で4時間攪拌した。反応混合物を DCM (100 mL) で希釈し、1 N HCl (30 mL × 3)、飽和 NaHCO₃ 水溶液 (30 mL × 3) 及びブライン (30 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、真空下で濃縮して、標題中間体 (1.70 g、粗製) を無色油状物として得た。

30

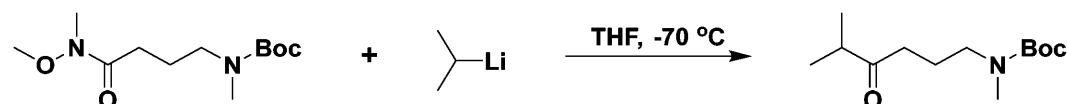
【0138】

中間体9の調製

tert-ブチルメチル (5-メチル-4-オキソヘキシル) カルバメート

【0139】

【化22】



40

【0140】

N₂ 雰囲気下、-70 °C に冷却した THF (5 mL) に、tert-ブチル (4-(メトキシ(メチル)アミノ)-4-オキソブチル) (メチル) カルバメート (中間体8) (200 mg、粗製) を溶解した溶液に、イソプロピルリチウム (ペンタン中 3.2 mL、2.24 mmol、0.7 M) を滴下した。得られた混合物を -70 °C で2時間攪拌した。混合物を飽和 NH₄Cl 水溶液 (15 mL) でクエンチし、EtOAc (30 mL × 2) で抽出した。合わせた有機層をブライン (30 mL) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を FCC (PE/EtOAc = 10:1) により更に精製して、標題中間体 (60 mg) を無色油状物として得た。

50

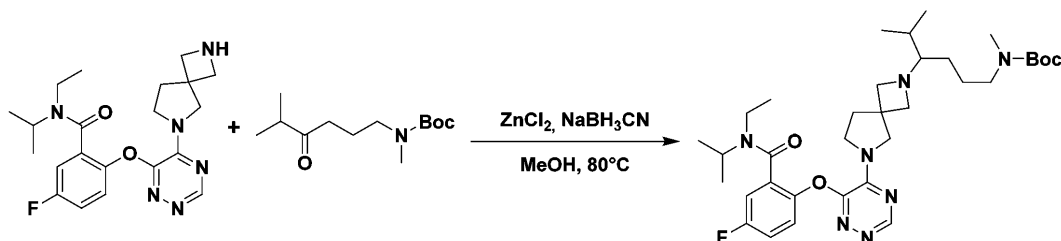
【0141】

化合物60の調製

tert-ブチル(4-(6-(6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-5-メチルヘキシル)(メチル)カルバメート

【0142】

【化23】



10

【0143】

MeOH(50mL)に、2-((5-(2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピルベンズアミド(中間体3)(600mg、1.45mmol)及びtert-ブチルメチル(5-メチル-4-オキソヘキシル)カルバメート(中間体9)(330mg、1.37mmol)を溶解した溶液にZnCl₂(789mg、5.79mmol)を添加した。得られた混合物を80℃で2時間攪拌した。次いで、NaBH₃CN(729mg、11.6mmol)を添加し、反応混合物を80℃で一晩攪拌した。室温に冷却した後、混合物を減圧下で濃縮して粗残渣を得、これをDCM(50mL)で希釈し、飽和NH₄Cl水溶液(50mL)でクエンチし、DCM(50mL×3)で抽出した。合わせた有機層を食塩水(50mL)で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、濾液を減圧下で濃縮して粗生成物を得、これをFCC(DCM/MeOH=10:1)により更に精製して、標題化合物(400mg、収率42%)が白色固体として得た。

20

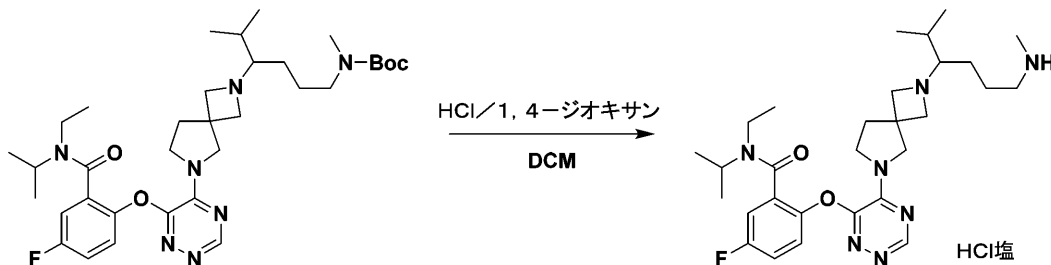
【0144】

化合物67

N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(2-メチル-6-(メチルアミノ)ヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドヒドロクロリド

【0145】

【化24】



40

【0146】

DCM(10mL)に、tert-ブチル(4-(6-(6-(2-(エチル(イソプロピル)カルバモイル)-4-フルオロフェノキシ)-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-5-メチルヘキシル)(メチル)カルバメート(化合物60)(1g、1.56mmol)を溶解した溶液に、ジオキサン中の4M HCl(5mL、20mmol)を添加し、得られた混合物を室温で1時間攪拌した。反応混合物を真空中で濃縮して、標題化合物(960mg、粗製、HCl

50

塩)を得、これを更に精製することなく次工程で直接使用した。

【0147】

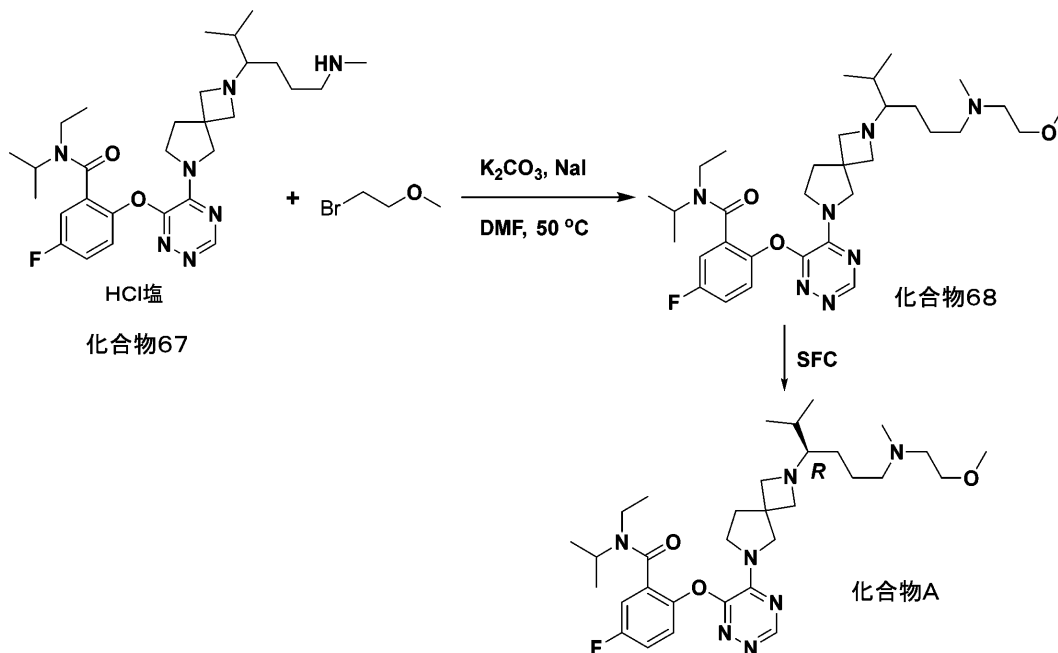
化合物A

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミド

【0148】

【化25】

10



20

【0149】

DMF (5 mL) に、N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メチル-6-(メチルアミノ)ヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドヒドロクロリド (化合物67) (480 mg、粗製)、K₂CO₃ (700 mg、5.07 mmol) 及び NaI (400 mg、2.67 mmol) を混合した混合物に、1-ブプロモ-2-メトキシエタン (230 mg、1.65 mmol) を添加した。得られた混合物を 50 °C で一晩攪拌した。室温に冷却した後、反応混合物を H₂O (30 mL) でクエンチし、DCM (30 mL × 3) で抽出した。合わせた有機層をブライン (30 mL × 3) で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥させ、濾過し、濃縮して粗残渣を得た。残渣を FCC (DCM/MeOH = 10 : 1) によって精製し、N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)オキシ)ベンズアミド (化合物68) (250 mg、収率 48%) を黄色油状物として得た。

30

40

【0150】

N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミド (化合物68) (方法Bによって得られたいくつかのバッチから合わせて 960 mg) を、最初に、DAICEL CHIRALPAK IG (カラム: 250 × 30 mm 10 μm、移動相: A : 超臨界CO₂、B : EtOH (0.1% アンモニア)、A : B = 40 : 60、60 mL/分) を用いる SFC により精製し、更に、Boston

50

Prime (カラム：150×30mm 5μm、移動相A：H₂O (10mM NH₄HCO₃)、移動相B：ACN、流量：25mL/分、勾配条件B/A 55%~85%)を用いる分取HPLCにより精製して、標題化合物 (270mg) を無色油状物として得た。

【0151】

¹H NMR (400MHz, メタノール-d₄) : δ = 8.40 (s, 1H), 7.47-7.32 (m, 1H), 7.30-7.10 (m, 2H), 4.24-4.01 (m, 2H), 3.89-3.60 (m, 3H), 3.48 (br s, 3H), 2.63-2.51 (m, 2H), 2.43-2.32 (m, 2H), 2.29-2.07 (m, 6H), 1.86-1.72 (m, 1H), 1.62-1.44 (m, 2H), 1.39-1.02 (m, 10H), 0.99-0.66 (m, 9H). いくつかのプロトンは溶媒ピークによって隠れており、記録されていない。

10

【0152】

LCMS (ESI) (方法2) : R_t = 1.965分、m/z 実測値 600.3 [M+H]⁺。

【0153】

SFC (方法11) : R_t = 4.904分。

【0154】

実施例3 - (R) - N - エチル - 5 - フルオロ - N - イソプロピル - 2 - ((5 - (2 - (6 - ((2 - メトキシエチル) (メチル) アミノ) - 2 - メチルヘキサン - 3 - イル) - 2, 6 - ジアザスピロ [3.4] オクタン - 6 - イル) - 1, 2, 4 - トリアジン - 6 - イル) オキシ) ベンズアミド (化合物A) の合成 - 調製方法C

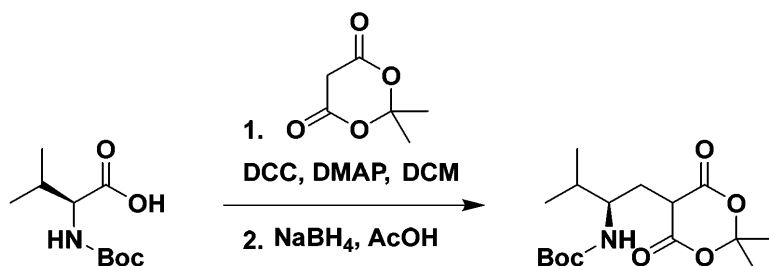
20

中間体227の調製

tert - ブチル (R) - (1 - (2, 2 - ジメチル - 4, 6 - ジオキソ - 1, 3 - ジオキサン - 5 - イル) - 3 - メチルブタン - 2 - イル) カルバメート

【0155】

【化26】



30

【0156】

-10~0℃で予備冷却したDCM (607kg) 中のBoc-L-バリン (44.9kg)、2, 2 - ジメチル - 1, 3 - ジオキサン - 4, 6 - ジオン (32.9kg) 及びDMAP (35.5kg) を、DCM (613kg) にDCC (55.5kg) を溶解した溶液に3時間にわたって添加し、-10~0℃で16時間エージンした。温度を10℃未満に維持しながら、10%クエン酸水溶液 (449kg) を添加した。得られたスラリーを0から10℃で2時間エージングし、次いで濾過した。濾過ケーキをDCM (91kg) で洗浄した。濾液を分離し、有機層を10%クエン酸水溶液 (450kgで2回) 及び10%NaCl水溶液 (449kg) で洗浄した。有機相 (1200kg) に、温度を-10~0℃に維持しながら酢酸 (75.0kg) を添加した。水素化ホウ素ナトリウム (18.0kg) を、温度を-10℃~0℃の範囲に維持しながら5時間にわたって小分けにして添加し、次いで、得られた混合物を-10℃~0℃で更に16時間エージングした。混合物を15~25℃に加温し、2時間エージングした。次いで、混合物を14%NaCl水溶液 (450kg) で洗浄し、続いて14%NaCl水溶液 (432kg) で2回目の洗浄を行い、最後に水で洗浄した (444kg)。有機相を減圧下で2~4体積ま

40

50

で濃縮した。イソプロパノール（143 kg）を残渣に添加し、減圧下で4～5体積まで濃縮した。－10～0℃に冷却し、8時間エージングした後、得られたスラリーを濾過し、IPA（38 kg）で洗浄し、乾燥させて、標題中間体（46.7 kg、収率69%）を白色固体として得た。

【0157】

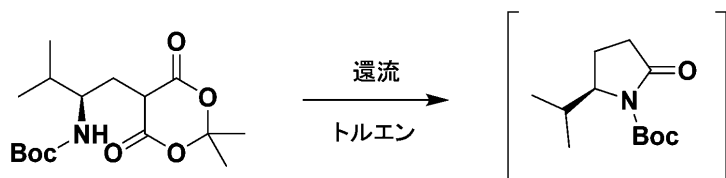
中間体228の調製

tert-ブチル（R）-2-イソプロピル-5-オキソピロリジン-1-カルボキシレート

【0158】

【化27】

10



【0159】

トルエン（333 kg）中のtert-ブチル（R）-（1-（2，2-ジメチル-4，6-ジオキソ-1，3-ジオキサン-5-イル）-3-メチルブタン-2-イル）カルバメート（中間体227）（46.7 kg）を加熱還流し、4時間エージングした。混合物を周囲温度に冷却し、濾過し、トルエン（20 kg）で洗浄した。合わせた濾液を減圧下で濃縮乾固して、所望の化合物（31.05 kg、収率96%）を油状物として得、これを更に精製することなく直接使用した。

20

【0160】

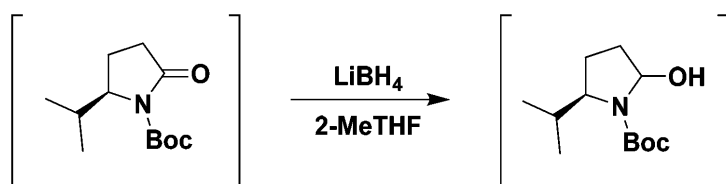
中間体229の調製

tert-ブチル（5R）-2-ヒドロキシ-5-イソプロピルピロリジン-1-カルボキシレート

【0161】

【化28】

30



【0162】

2-MeTHF（26.7 kg）中のtert-ブチル（R）-2-イソプロピル-5-オキソピロリジン-1-カルボキシレート（中間体228）（30.9 kg）を－5～5℃に冷却した。LiBH₄の2-MeTHF溶液（1M，45.2 kg，54.4 mol）を3時間にわたって添加し、混合物を4時間エージングした。5% NaHCO₃の冷水溶液（163 kg）を－5～5℃で3時間にわたって添加し、更に2時間エージングした。混合物を周囲温度に加温し、更に2時間エージングした。水層を分離し、有機層を10% NaCl水溶液（170 kg）及び水（155 kg）で洗浄した。水洗浄中に、エマルジョンが形成され、分離させるために固体NaCl（3.1 kg）を添加した。水層を除去した後、有機層を減圧下で濃縮乾固して、所望の化合物（28.5 kg、収率91%）を油状物として得、これを更に精製することなく直接使用した。

40

【0163】

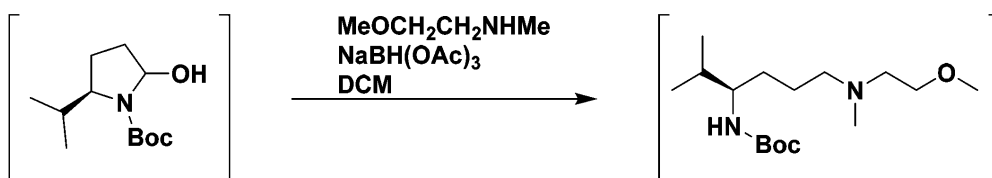
中間体230の調製

tert-ブチル（R）-（6-（（2-メトキシエチル）（メチル）アミノ）-2-メチルヘキサン-3-イル）カルバメート

50

【0164】

【化29】



【0165】

DCM (344 kg) 中の *tert*-ブチル (5*R*)-2-ヒドロキシ-5-イソプロピルピロリジン-1-カルボキシレート (中間体229) (28.55 kg) を15~25℃で2-メトキシ-N-メチルエタン-1-アミン (12.3 kg、138.0 mol) で処理し、得られた混合物を1時間エージングした。ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド (40.12 kg) を、温度を15~25℃の間に維持しながら5時間にわたって小分けにして添加し、得られた混合物を48時間エージングした。温度を15~25℃の間に維持しながら、8% NaOH 水溶液 (184 kg) を2時間にわたって添加することによって反応混合物をクエンチし、混合物を更に2時間エージングした。水層を分離し、有機層を水 (169 kg) で洗浄した。次いで、有機層を減圧下で濃縮乾固して、標題中間体 (33.26 kg、収率88%) を油状物として得、これを更に精製することなく直接使用した。

10

20

【0166】

中間体231の調製

(*R*)-*N*¹-(2-メトキシエチル)-*N*¹, 5-ジメチルヘキサン-1, 4-ジアミン、二塩酸塩

【0167】

【化30】



30

【0168】

イソプロパノール (84.80 kg) に HCl を溶解した 4 モル 溶液に、イソプロパノール (25.6 kg) に *tert*-ブチル (*R*)-(6-((2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)カルバメート (中間体230) (32.38 kg) を溶解した溶液を周囲温度で3時間にわたって添加し、混合物を周囲温度で更に19時間エージングした。次いで、メチル *tert*-ブチルエーテル (95.25 kg) を1時間にわたって添加し、混合物を2.5時間エージングした。得られたスラリーを濾過し、MTBE (53 kg) で洗浄した。濾過ケーキを乾燥させて、標題化合物 (23.92 kg、収率81%) を白色固体として得た。

40

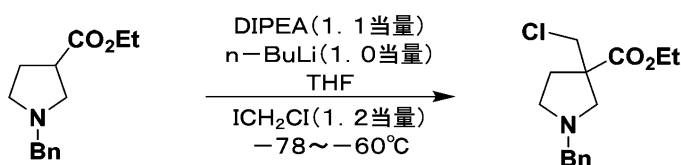
【0169】

中間体232の調製

エチル 1-ベンジル-3-(クロロメチル)ピロリジン-3-カルボキシレート

【0170】

【化31】



【0171】

50

−35〜−25℃に冷却したTHF（6 L）にDIPEA（952 g、1.1当量）を溶解した溶液に、−25℃未満に温度を維持しながらn-BuLi（2.33 kg、ヘキサン中2.5 M、1.0当量）を添加した。得られた混合物を−35〜−25℃で更に30分間エージングし、次いで−78〜−60℃に冷却した。THF（2 L）にエチル1-ベンジルピロリジン-3-カルボキシレート（2 kg、1.0当量）を溶解した溶液を−78〜−60℃で添加し、更に30分間攪拌した。次いで、クロロヨードメタン（1.81 kg、1.2当量）を−78〜−60℃で投入した。反応混合物を−60〜−40℃で2時間エージングした。反応混合物を0〜10℃の温度でクエン酸水溶液（6 L H₂O 中660 g）に添加し、得られた混合物を20〜30℃で更に20分間エージングした。層を分離した後、水層をEtOAc（6 L）で抽出し、合わせた有機層をブライン（6 L）で洗浄し、次いで50〜60℃に加温した。シュウ酸（2.22 kg）を50〜60℃で投入した。得られた混合物を50〜60℃で3時間攪拌し、次いで、20〜30℃に冷却し、一晚エージングした。得られた固体を濾過し、ケーキを酢酸エチル（2 L）で洗浄した。ウェットケーキをトルエン（4 L）、H₂O（8 L）及びK₃PO₄（1.5当量）に添加し、得られた混合物を20〜30℃で20分間エージングした。層を分離した後、水層をトルエン（2 L）で抽出した。有機層を合わせ、水（2 L）で2回洗浄した。有機相を減圧下で濃縮して、4.2 kgの所望の化合物をトルエン溶液として得た（アッセイにより46重量%、アッセイ収率80%）。

10

【0172】

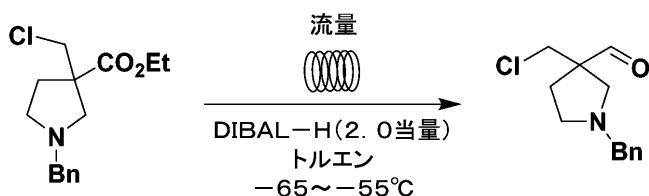
中間体233の調製

20

1-ベンジル-3-(クロロメチル)ピロリジン-3-カルバルデヒド

【0173】

【化32】



【0174】

30

流動化学システムで反応を行った。すなわち、トルエン（26 L）にエチル1-ベンジル-3-(クロロメチル)ピロリジン-3-カルボキシレート（中間体232）（4.4 kg）を溶解した溶液を26.7 mL/分で圧送し、−60℃に冷却した。冷却後、次いで、これをトルエンにDIBAL-H（28.1 mol）を溶解した冷却溶液と−60℃（28 L）で32.1 mL/分のポンプ流量で混合した。混合物を−60℃でパーフルオロアルコキシ（PFA）コイル管反応器に通した（合計流量58.8 mL/分、滞留時間5秒）。得られた混合物を冷却したMeOH（−60℃）と混合し、これを15.2 mL/分の速度で圧送した。この混合溶液を別のPFAコイルチューブリアクタに−60℃で圧送した（合計流速74 mL/分、滞留時間5秒）。得られた混合物を、20重量%のロッシェル塩水溶液（20 V）が入ったレシーバーに回収した。層を分離し、有機相を水で2回洗浄した（2×44 L）。有機相を、同様の方法で調製した別の3.0 kgのバッチと合わせ、減圧下で濃縮して、20.8 kgの所望の化合物のトルエン溶液を得（HPLCによるアッセイで25.5重量%、アッセイ収率85%が得られた）、これを更に精製することなく直接使用した。

40

【0175】

¹H NMR（300 MHz, Chloroform-d）：δ 9.62（s, 1H）, 7.39–7.20（m, 5H）, 3.83–3.57（m, 4H）, 2.96（d, J=10.2 Hz, 1H）, 2.80–2.55（m, 3H）, 2.17（ddd, J=13.9, 7.9, 6.1 Hz, 1H）, 1.83（ddd, J=13.4, 7.8, 5.5 Hz, 1H）。

50

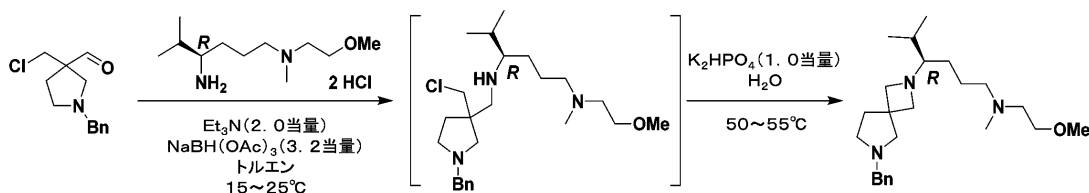
【0176】

中間体234の調製

(R)-4-(6-ベンジル-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-N-(2-メトキシエチル)-N,5-ジメチルヘキサン-1-アミン

【0177】

【化33】



10

【0178】

トルエン (30 L) 及び (R)-N¹-(2-メトキシエチル)-N¹,5-ジメチルヘキサン-1,4-ジアミン、二塩酸塩 (中間体231) (3.47 kg) で希釈した、トルエン (3.0 kg、10重量%) に1-ベンジル-3-(クロロメチル)ピロリジン-3-カルバルデヒド (中間体233) を溶解した溶液に、トリエチルアミン (2.55 kg、25.2 mol) を20~30℃で添加した。得られた混合物を20~30℃で2時間エージングした。次いで、ナトリウムトリアセトキシボロヒドリド (9.0 kg) を20~30℃で投入し、混合物を12時間エージングした。反応混合物を5~15℃に冷却し、温度を35℃未満に維持しながら25重量% NaOH水溶液 (25 L、約16.75当量) を添加した。得られた混合物を20~30℃で25分間エージングし、層を分離した。有機層を15重量%のNaCl水溶液 (10 L) で洗浄し、層を再度分離し、水 (18 L) を有機相に投入した。水相のpHを、4M HCl水溶液を用いて、内部温度を35℃未満に維持しながら、6~7に調整した。次いで、有機相を廃棄し、水相を分離し、K₂HPO₄でpH 8~9に塩基性化した。

20

【0179】

得られた混合物を50~55℃に加温し、3時間エージングした。次いで、反応混合物を周囲温度に冷却し、他の2つのバッチ (2.4 kg + 3.0 kg) と合わせた。合わせた流れをメチル tert-ブチルエーテルで3回洗浄した (3×40 L)。得られた水層に更なるメチル tert-ブチルエーテル (83 L) を添加し、水相を8重量%のNaOH水溶液を用いて、15~35℃の温度を維持しながら、pH 9~10に塩基性化した。水層を分離し、有機層を水で3回洗浄した (3×30 L)。次いで、有機層を減圧下で約3体積まで濃縮し、次いで、メタノールで3回フラッシングし (3×30 L)、濃縮乾固して、所望の中間体 (12.4 kg、単離収率90%) を淡黄色油状物として得、これを更に精製することなく直接使用した。

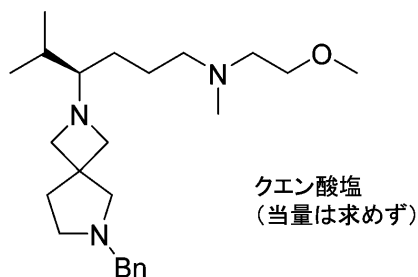
30

【0180】

中間体234a (中間体234のクエン酸塩) の調製

【0181】

【化34】



40

【0182】

EtOH (80 mL) 及び中間体234 (20 g) を丸底フラスコに添加した。次に、

50

EtOHにクエン酸を溶解した0.5M溶液(100mL、1当量)を丸底フラスコ中の混合物に室温で添加した。その後、混合物を乾燥するまで蒸発させた(ロータリーエバポレーター、40℃)。アセトニトリル(200mL)を残渣に添加し、混合物を乾燥するまで蒸発させた(ロータリーエバポレーター、40℃)。アセトニトリル(100mL)を残渣に添加し、室温で磁気加熱プレートを用いて一晩攪拌した。最後に、中間体234aを濾別し、室温で乾燥させた。

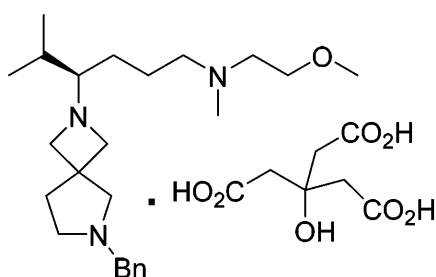
【0183】

中間体234(中間体234b)のクエン酸塩の結晶形態の調製

【0184】

【化35】

10



結晶比
中間体／クエン酸 3／2

20

【0185】

中間体234a(3.72g)を室温でアセトニトリル(20mL)に添加し、混合物を攪拌した。反応混合物が均一になるまで、混合物を60℃に加熱した(約10分)。次に、混合物を0.5℃/分の速度で50℃まで冷却した。次に、シードを添加し(19mgの中間体234a、0.5w/w%)、混合物を攪拌しながら3時間30分間エージングした。次に、混合物を8時間かけて20℃まで指数2、3で非線形に冷却した。得られた混合物を一晩攪拌し、生成物を濾別し、乾燥させた(フード内で室温で一晩)。

【0186】

単離後、中間体234b(2.75g; 収率73.9%)を中間体234のクエン酸塩の結晶形態として得た。得られた中間体／クエン酸の比は3／2(NMR)である。

30

【0187】

上記の非線形冷却は、以下の式に従って行われた。

【0188】

規定の冷却期間中、30秒毎に新しい線形ランプが開始される。ランプは、以下の式に従って計算される。

【0189】

【数1】

$$T_{set} = T_{startvalue} - \left[(T_{startvalue} - T_{endvalue}) * \left(\frac{t_{action} + 30s}{Duration} \right)^n \right]$$

40

Tset: 各新規ランプの設定値

Tstartvalue: 冷却軌跡開始時の混合物温度の測定値

Tendvalue: 冷却軌跡の終了規定値

taction: 冷却開始からの実時間

Duration: 定義された冷却持続時間

n: 指数

【0190】

¹H NMR(400MHz, MeOH-d₄) δ ppm 0.91(3H, d, J=6.88Hz) 0.98(3H, d, J=6.88Hz) 1.46-1.57(2

50

H, m) 1.67–1.87 (2 H, m) 1.94–2.03 (1 H, m) 2.20–2.29 (2 H, m) 2.62–2.69 (2 H, m) 2.72–2.77 (4 H, m) 2.77–2.82 (2 H, m) 2.90 (2 H, t, J = 7.32 Hz) 2.95–3.02 (2 H, m) 3.07–3.16 (2 H, m) 3.16–3.22 (2 H, m) 3.37 (3 H, s) 3.68–3.72 (2 H, m) 3.83–3.89 (2 H, m) 3.90–3.92 (2 H, m) 3.94–4.06 (2 H, m) 7.32–7.43 (5 H, m)。

【0191】

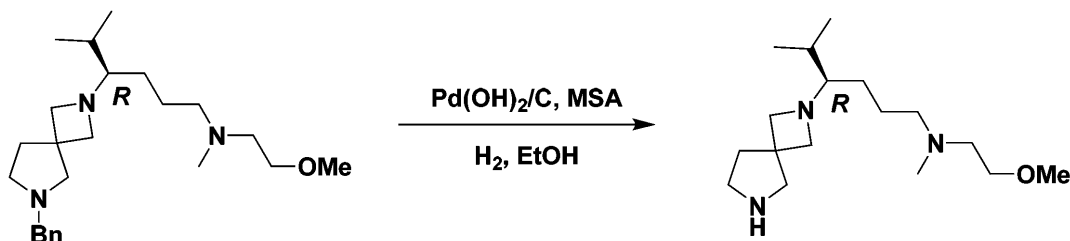
中間体224の調製

(R)-N-(2-メトキシエチル)-N,5-ジメチル-4-(2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)ヘキサン-1-アミン

10

【0192】

【化36】



20

【0193】

−5〜5℃に冷却したEtOH(1.47kg)中の水酸化パラジウム炭素(1.2kg)に、メタンスルホン酸(MSA)(11kg)、(R)-4-(6-ベンジル-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-N-(2-メトキシエチル)-N,5-ジメチルヘキサン-1-アミン(中間体234)(10kg)及びEtOH(250L)を添加した。混合物を35〜45℃に加温し、水素雰囲気(0.27〜0.40MPa)下で16〜20時間攪拌した。混合物を珪藻土(20kg)で濾過し、パッドをEtOH(24L)で洗浄した。濾液を減圧下(40℃未満)で2〜3体積まで濃縮し、次いで、2-MeTHF(73kg及び47kg)で2回フラッシングして、2〜3体積の溶液を得た。2-MeTHF(65kg)で希釈した後、10%硫酸ナトリウム水溶液(30kg)を添加し、混合物を0〜10℃に冷却し、続いて16%NaOH水溶液(50kg)を添加してpHを13〜14に調整した。温度を15〜25℃に調整し、30〜60分間攪拌した。水層を分離し、2-MeTHF(47kg×2)で2回抽出した。合わせた有機層を減圧下(40℃未満)で3〜4体積に濃縮し、2-MeTHF(950g)を添加した。減圧下(40℃未満)で3〜4体積に濃縮した後、得られた溶液を2-MeTHF(30kg)で希釈し、4Aモレキュラーシーブ(25kg)に通して乾燥させ、2-MeTHF(30kg)で洗浄した。最終溶液を濃縮して、79%補正収率で90.1%のアッセイ純度を有する油状体として所望の化合物(6.7kg)が得られた。

30

【0194】

中間体225の調製

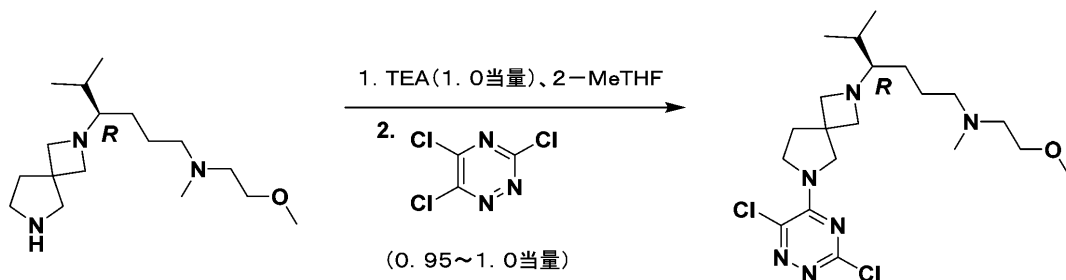
(R)-4-(6-(3,6-ジクロロ-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-N-(2-メトキシエチル)-N,5-ジメチルヘキサン-1-アミン

40

【0195】

50

【化 3 7】



10

【0196】

(R)-N-(2-メトキシエチル)-N,5-ジメチル-4-(2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)ヘキサン-1-アミン(中間体224)(100g)に、2-MeTHF(430g)及びTEA(68g)を添加し、混合物を-50~-40℃に冷却した。2-MeTHF(172g)中の3,5,6-トリクロロ-1,2,4-トリアジン(62g)を添加し、混合物を1~3時間攪拌した。得られた混合物を-20~-10℃に加温し、7%NaHCO₃水溶液を添加し、混合物を20~30℃に加温し、30~60分間攪拌した。水層を除去し、有機層を10%Na₂SO₄(500g)で洗浄した。有機層を4Åモレキュラーシーブ(220g)に通して乾燥させ、2-MeTHF(180g)で洗浄した。標題中間体を、アッセイ収率90%で、2-14.8重量%のMeTHFの溶液として得た。

20

【0197】

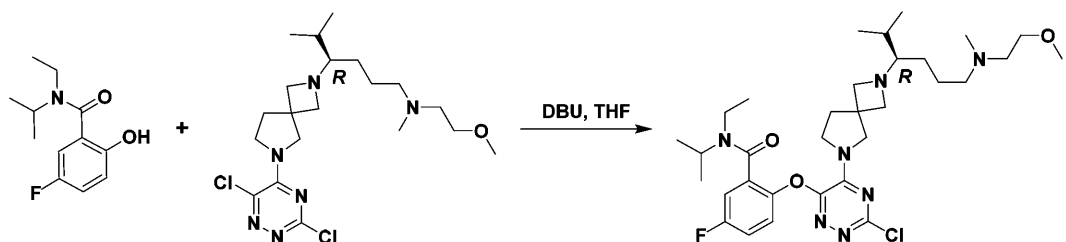
化合物393

(R)-2-((3-クロロ-5-(2-(6-((2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピルベンズアミド

化合物393の合成方法A

【0198】

【化 3 8】



30

【0199】

無水THF(15mL)に、N-エチル-5-フルオロ-2-ヒドロキシ-N-イソプロピルベンズアミド(中間体28)(1.10g、4.88mmol)、(R)-4-(6-(3,6-ジクロロ-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-N-(2-メトキシエチル)-N,5-ジメチルヘキサン-1-アミン(中間体225)(1.70g、3.82mmol)及びDBU(750mg、4.93mmol)を混合した混合物を40℃で8時間攪拌した。室温に冷却した後、混合物を減圧下で濃縮し、得られた残渣をDCM(60mL)で希釈し、H₂O(20mL×3)で洗浄した。×有機層を無水Na₂SO₄で乾燥させ、濾過し、減圧下で濃縮して粗生成物を得、これを精製FCC(MeOH/DCM=0%~10%)により精製して黄色油状物(1.40g)を得、これを更に、DAICEL CHIRALPAK AD(カラム:250×50mm、10μm×移動相:A:超臨界CO₂、B:EtOH

40

50

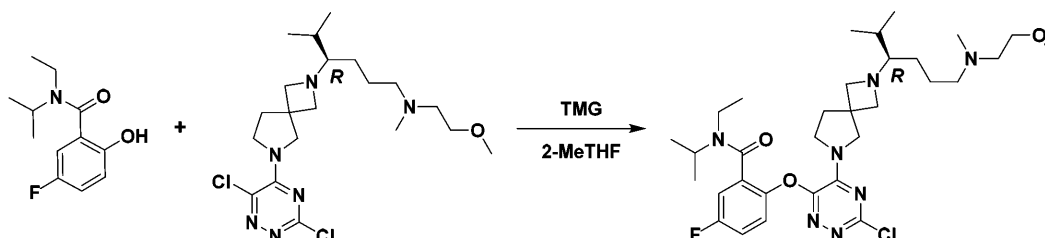
(0.1%アンモニア)、70 mL/分でA:B=50:50;カラム温度:38℃;ノズル圧力:100バール;ノズル温度:60℃;蒸発器温度:20℃;トリマー温度:25℃;波長:220 nm)を用いるSFCにより分離して、標題化合物(1.0 g)を得た。

【0200】

化合物393の合成方法A

【0201】

【化39】



10

【0202】

20~30℃の2-MeTHF(40 g)に、(R)-4-(6-(3,6-ジクロロ-1,2,4-トリアジン-5-イル)-2,6-ジアズスピロ[3.4]オクタン-2-イル)-N-(2-メトキシエチル)-N,5-ジメチルヘキサン-1-アミン(中間体225)(2-14.8重量%のMeTHF溶液676 g、中間体225について補正すると100 g)及びN-エチル-5-フルオロ-2-ヒドロキシ-N-イソプロピルベンズアミド(中間体28)(50.6 g)を溶解した2-MeTHF溶液に、テトラメチルグアニジン(31 g)を添加し、混合物を40~48時間攪拌した。7%NaHCO₃水溶液(500 g)を添加し、混合物を30~60分間攪拌した。水層を除去し、有機層を4%NaOH水溶液(2×500 g)で2回洗浄し、10%Na₂SO₄水溶液(500 g)で1回洗浄した。有機層を減圧下(40℃未満)で2.2~3.0体積まで濃縮し、2-MeTHF及び含水量の両方が1.0%未満になるまでMeOH(1×790 g及び2×395 g)で3回フラッシングして、60.1重量%のメタノール溶液として86%のアッセイ収率で所望の化合物を得た。

20

30

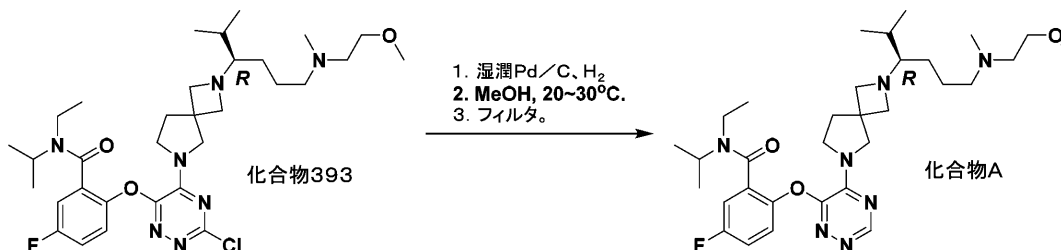
【0203】

化合物A

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミド

【0204】

【化40】



40

【0205】

(R)-2-((3-クロロ-5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)オキシ)-N-エチル-5-フルオロ-

50

N-イソプロピルベンズアミド（化合物393）（60.1重量%のMeOH溶液163.93g、化合物393について補正すると100g）、パラジウム炭素（10g）及びMeOH（316g）のメタノール溶液を、水素雰囲気（0.20から0.30MPa）下、20～30℃で18時間撹拌した。混合物を珪藻土（75g）で濾過し、ケーキをMeOH（158g）で洗浄した。濾液を減圧下（40℃未満）で約3体積に濃縮し、次いで、酢酸イソプロピル（IPAc、870g）でフラッシュして約3体積に濃縮した。次いで、混合物をIPAc（696g）で希釈し、20%Na₂CO₃水溶液を添加した（500g）。混合物を30～60分間撹拌した。水層を除去した。有機層を水（500g）で洗浄し、次いで、45℃未満の減圧下で約3体積に濃縮した。48.1重量%のIPAc溶液として、約90%のアッセイ収率で標題中間体を得た。

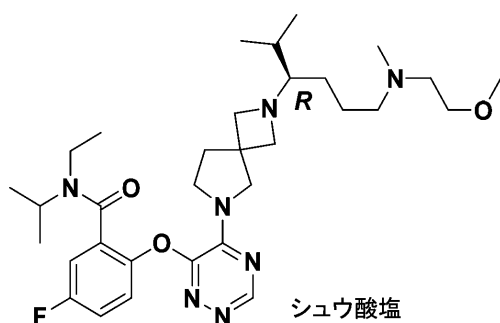
10

【0206】

実施例4-（R）-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-（（5-（2-（6-（（2-メトキシエチル）（メチル）アミノ）-2-メチルヘキサン-3-イル）-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル）-1,2,4-トリアジン-6-イル）オキシ）ベンズアミドオキサレート（化合物A3）の合成

【0207】

【化41】



20

【0208】

化合物A3

20mLのACN（20mL）に（R）-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-（（5-（2-（6-（（2-メトキシエチル）（メチル）アミノ）-2-メチルヘキサン-3-イル）-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル）-1,2,4-トリアジン-6-イル）オキシ）ベンズアミド（化合物A）（270mg、0.450mmol）を溶解した溶液に、シュウ酸（81.0mg、0.900mmol）を添加した。添加後、反応混合物を室温で1時間撹拌した。次いで、反応混合物を濃縮し、残渣をACN及び脱イオン水に再溶解し、凍結乾燥させて、標題化合物（350mg）を白色固体として得た。

30

【0209】

¹H NMR（400MHz, Me₂SO-d₆）：δ=8.48（s, 1H）, 7.52-7.11（m, 3H）, 4.54-3.64（m, 12H）, 3.40-3.34（m, 5H）, 3.23-3.13（m, 2H）, 2.90（s, 3H）, 2.54-2.27（m, 2H）, 2.19-2.03（m, 1H）, 1.97-1.77（m, 2H）, 1.75-1.50（m, 2H）, 1.35-0.65（m, 17H）。

40

【0210】

¹H NMR（400MHz, DMSO-d₆）：δ=8.51（s, 1H）, 7.51-7.29（m, 3H）, 4.29-3.34（m, 12H）, 3.23-2.84（m, 7H）, 2.70（s, 3H）, 2.35-2.09（m, 2H）, 2.05-1.85（m, 1H）, 1.81-1.58（m, 2H）, 1.56-1.33（m, 2H）, 1.18-0.60（m, 17H）。

【0211】

LCMS（ESI）（方法2）：R_t=1.969分、m/z実測値600.4 [M+

50

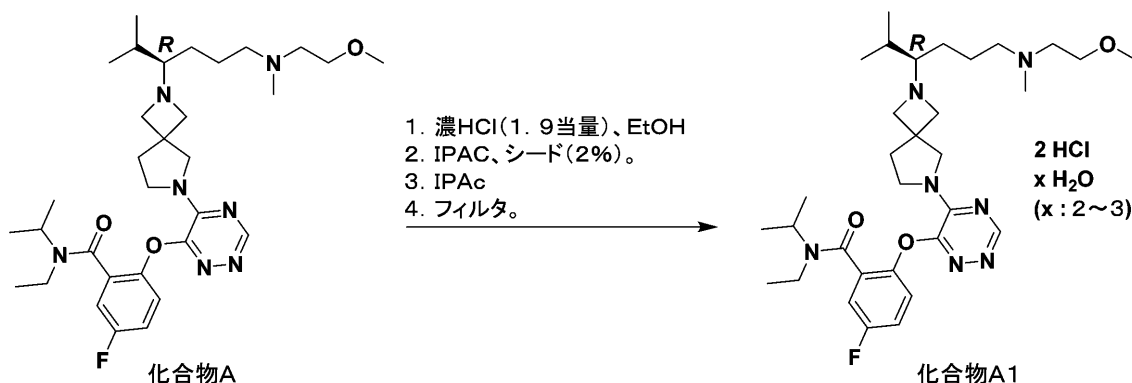
H]⁺。

【0212】

実施例5－化合物A1の合成

【0213】

【化42】



10

【0214】

IPAC(360g)に化合物A(IPAC中48重量%溶液207.90g、活性化化合物A100g)を溶解した溶液に、EtOH(63g)を20℃~25℃で添加した。次いで、溶液をEtOH(49.5g)中の濃HCl(32.9g)で約15分間にわたって処理した。混合物に結晶性化合物A1のシード(2g、2%シード負荷)を播種し、次いで、18時間エージングした。IPAC(870g)を20~25℃で4時間にわたってゆっくり添加し、スラリーを更に18時間攪拌した。約5℃に冷却した後、生成物を濾過し、IPAC(522g)で洗浄し、20~30℃で真空下で乾燥させて、弱結晶性化合物A1を白色固体として得た(収率91.0%、115.4g)。(注:反応に使用した少量のシード材料は、小規模の類似の反応プロトコルを介して得た)

20

【0215】

再結晶:弱結晶性化合物A1(100g)、EtOH(166g)、精製水(21.5g)及びIPAC(178g)の溶液を20~30℃で0.5から2時間攪拌して、透明な溶液を得た。追加のIPAC(522g)を1~2時間にわたって滴下し、次いで、混合物に結晶性化合物A1のシード(2g、2%シード負荷)を播種した。次いで、混合物を18~20時間エージングし、IPAC(348g)を20~30℃で12時間にわたってゆっくり添加し、スラリーを更に55~60時間攪拌した。生成物を濾過し、IPAC(158g)で洗浄し、20~30℃で真空中で乾燥させて、化合物A1を白色固体(収率85%、正味85.0g)として得た。

30

【0216】

¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz): δ=11.60(1H, brs), 10.8(1H, brs), 8.52(1H, s), 7.36(3H, m), 3.97-4.20(7H, m), 3.64-3.71(4H, m), 3.47(7H, m), 3.25(2H, m), 3.05(3H, m), 2.73(3H, s), 2.10-2.45(1H, m), 1.99(1H, m), 1.78(2H, m), 1.55(2H, m), 0.83-1.12(12H, m), 0.70(2H, m)。

40

【0217】

LCMS(方法7): R_t=0.669分、m/z実測値600.5[M+H]⁺。

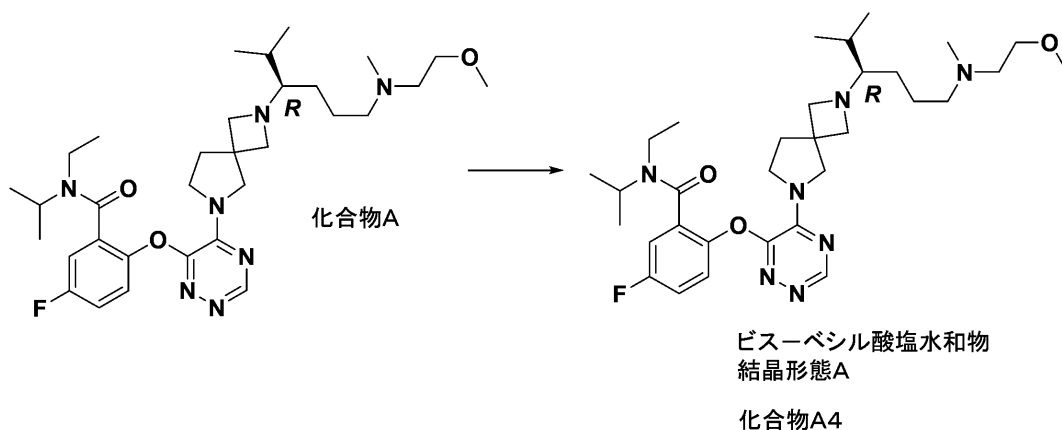
【0218】

実施例6－(R)－N－エチル－5－フルオロ－N－イソプロピル－2－((5－(2－(6－((2－メトキシエチル)(メチル)アミノ)－2－メチルヘキサン－3－イル)－2,6－ジアザスピロ[3.4]オクタン－6－イル)－1,2,4トリアジン－6－イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物(化合物A4)の結晶形態Aの合成(水当量は求めず)

50

【0219】

【化43】



10

【0220】

43.06 gのベンゼンスルホン酸（遊離塩基化合物Aに対して2当量）をアセトン／水95／5 v／v混合物840 mLに添加し、溶解した。IPA cに化合物A（80 gのAPIを含む）を溶解した溶液192.8 gを添加した。材料が溶解し、透明な溶液が得られた。更にIPA c 80 mLを添加し、温度を25℃に調整した。2%のシードを添加し、混合物を25℃で1時間攪拌した。次いで、28.8 V（2312 mL）のIPA cを8時間かけて添加した。その後、懸濁液を25℃で18時間攪拌した。懸濁液を濾過し、アセトン／水／IPA c 23.75／1.75／75 v／v／vの混合物320 mLで洗浄した。122.91 gの結晶形態Aビスベシラート水和物（水当量は求めず）を得た。

20

【0221】

当業者は、上記の反応で使用する少量の初期シード材料が、小規模の同様の反応プロトコルを介して、シードを添加することなく、自発的な核形成を待つことによって得られることを理解するであろう。

【0222】

塩スクリーニング実験中に、ベシル酸塩の最初のシードも得た。これらの実験では、100 mgの遊離塩基を2 mLバイアルに量り入れ、次いで200 μLの酢酸エチル又はアセトンを添加して遊離塩基を溶解した。1当量の対イオン（ベンゼンスルホン酸）を試料に添加し、試料を25℃で3日間攪拌した。得られた懸濁液を遠心分離し、初期シードを得た。

30

【0223】

適切な量の結晶形態Aの（R）-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-（（5-（2-（6-（（2-メトキシエチル）（メチル）アミノ）-2-メチルヘキサン-3-イル）-2，6-ジアザスピロ〔3.4〕オクタン-6-イル）-1，2，4-トリアジン-6-イル）オキシ）ベンズアミドビスベシル酸塩水和物を重水素化DMSOに溶解し、1D¹H NMRスペクトルを記録した。

40

【0224】

Bruker 5mm PA BBO 600S3 BB-H-D-05 Z-GRD 高分解能プローブを備え、TOPSPIN 4.0ソフトウェアを実行するBruker AVANCE NEO-600 MHz NMR分光計を使用して、重水素化DMSO中の試料上の300 Kでの一次元プロトン実験を収集した。

【0225】

¹H NMR（600 MHz，DMSO-d₆）δ ppm 0.69（br s，2 H）0.82-0.98（m，9 H）1.07（br s，4 H）1.31-1.46（m，1 H）1.51（br d，J=2.91 Hz，1 H）1.69（br d，J=3.45 Hz，2 H）1.98（br s，1 H）2.06-2.45（m，

50

2 H) 2.77 (br s, 3 H) 2.87–3.19 (m, 3 H) 3.24 (br s, 1 H) 3.31 (s, 6 H) 3.64 (br s, 4 H) 3.71–4.59 (m, 7 H) 7.24–7.54 (m, 9 H) 7.61 (br d, $J=7.2$ Hz, 4 H) 8.45–8.60 (m, 1 H) 9.24 (br s, 1 H) 9.44–9.82 (m, 1 H)。

【0226】

実施例7 – (R) – N – エチル – 5 – フルオロ – N – イソプロピル – 2 – ((5 – (2 – (6 – ((2 – メトキシエチル) (メチル) アミノ) – 2 – メチルヘキサン – 3 – イル) – 2, 6 – ジアザスピロ [3.4] オクタン – 6 – イル) – 1, 2, 4 – トリアジン – 6 – イル) オキシ) ベンズアミドビスベシル酸塩水和物 (化合物A4) の結晶形態Aの代替合成 (水当量は求めず)

10

95/5のイソプロパノール/水の混合物 (24 mL) をフラスコに投入し、40℃に加熱した。ベンゼンスルホン酸 (4.31 g、98%) を添加した。続いて、IPA c中の19.3 gの化合物Aの溶液 (8 gの化合物Aを含有する) を添加した。更に、IPA cを16 mLを添加した。2%のシードを添加し、混合物を40℃で1時間攪拌した。次いで、IPA c (115.2 mL) を8時間かけて滴下した。次に、混合物を0℃に15時間にわたって冷却した。懸濁液を濾過し、ウェットケーキを (IPA/H₂O 95/5) / IPA c 1/6 (32 mL) で洗浄した。ウェットケーキを25℃で16時間乾燥させ、結晶形態Aビスベシラート水和物11.44 gを得た (水当量は求めず)。

【0227】

20

実施例において、化合物A4は請求項1に包含される化合物である。実施例における他の化合物は例示目的のためのものである。いくつかの中間体 (例えば、中間体234b) は、特許請求されている中間体である。

【0228】

上記の実験パートで使用した分析方法

上記の化合物の分析情報は、以下に記載する分析方法を使用することによって生成された。

【0229】

NMR法

いくつかのNMR実験は、Bruker Avance III 400分光計を使用して周囲温度 (298.6 K) で、内部重水素ロックを使用し、z勾配を有するBBO 400 MHz S1 5 mmプローブヘッドを装備し、プロトンについては400 MHz、炭素については100 MHzで動作して実施した。化学シフト (δ) は、パーツ・パー・ミリオン (ppm) で報告される。J値は、Hzで表される。

30

【0230】

いくつかのNMR実験は、周囲温度 (298.6 K) でVarian 400-MR分光計を使用し、内部重水素ロックを使用し、z勾配を有するVarian 400 4 NUC PFGプローブヘッドを装備し、プロトンについては400 MHz、炭素については100 MHzで動作して実施した。化学シフト (δ) は、パーツ・パー・ミリオン (ppm) で報告される。J値は、Hzで表される。

40

【0231】

いくつかのNMR実験は、Varian 400-VNMR S分光計を使用して周囲温度 (298.6 K) で、内部重水素ロックを使用し、z勾配を有するVarian 400 ASW PFGプローブヘッドを装備し、プロトンについては400 MHz、炭素については100 MHzで動作して実施した。化学シフト (δ) は、パーツ・パー・ミリオン (ppm) で報告される。J値は、Hzで表される。

【0232】

いくつかのNMR実験は、Bruker AVANCE III HD 300分光計を周囲温度 (298.6 K) で使用し、内部重水素ロックを使用し、z勾配を有するPABBO 300 S1 BBF-H-D-05 Z 5 mmプローブヘッドを装備し、プロ

50

トンについては 300 MHz、炭素については 75 MHz で動作して実施した。化学シフト (d) は百万分率 (ppm) で報告されている。J 値は、Hz で表される。

【0233】

L C M S (液体クロマトグラフィ／質量分析)

一般的な手順

高速液体クロマトグラフィ (H P L C) 測定は、それぞれの方法で指定された L C ポンプ、ダイオードアレイ (diode-array、D A D) 又は U V 検出器及びカラムを使用して実行した。必要に応じて、追加の検出器を含めた (以下の表 2 を参照されたい)。

【0234】

カラムからの流れは、大気圧イオン源で構成された質量分析計 (Mass Spectrometer、M S) にもたらされた。化合物の公称モノアイソトピック分子量 (M W) の同定を可能にするイオンを得るために、調整パラメータ (例えば、走査範囲、滞留時間など) を設定することは、当業者の知識の範囲内である。適切なソフトウェアでデータ収集を実行した。

10

【0235】

化合物は、それらの実験的保持時間 (R_t) 及びイオンによって記載される。データの表において別様に指定されない場合、報告された分子イオンは、 $[M+H]^+$ (プロトン化分子) 及び／又は $[M-H]^-$ (脱プロトン化分子) に相当する。化合物が直接イオン化不可能であった場合、付加物の種類は、特定される (すなわち、 $[M+NH_4]^+$ 、 $[M+HCOO]^-$ 、など)。複数の同位体パターン (B r、C l) を有する分子については、報告された値は、最も低い同位体質量に関して得られたものである。全ての結果は、使用される方法と一般的に関連する実験的不確定性を伴って得られた。

20

【0236】

以下、「S Q D」はシングル四重極検出器を、「R T」は室温を、「B E H」は架橋エチルシロキサン／シリカハイブリッドを、「H S S」は高強度シリカを、「D A D」はダイオードアレイ検出器を意味する。

【0237】

30

40

50

【表 2】

表 2：LCMS 法コード（mL／分で表される流量；℃で表されるカラム温度（T）；分で表されるランタイム）。

方法コード	器具	カラム	移動相	勾配	流量 —— カラムT	ランタイム																					
1	Agilent	Waters XBridge C18 (2.0×50mm、5uM)	移動相A:0.04%のTFAを含むH ₂ O; 移動相B:0.02%のTFAを含むACN	100%のAを1分間保持し、100%のAから40%のAまでのA勾配を4分間適用し、40%のAを2.5分間で15%のAまで下げ、次いで2分間で100%のAに戻し、0.5分間保持した。後の時間は0.5分間である。	0.8 —— 50	10																					
2	Agilent	Waters XBridge C18 (2.0×50mm、5um)	移動相A:0.04%のTFAを含むH ₂ O; 移動相B:0.02%のTFAを含むACN	最初に、90%のAを0.8分間保持した。次いで、3.7分で20%のA及び80%のBに勾配を適用し、3分間保持した。次いで、2分で90%のAに戻り、0.5分間保持した。後の時間は0.5分である。	0.8 —— 50	10																					
7	MS6120を有するAgilent LC 1260	XBridge C18、4.6×150mm、3.5μm	移動相A H ₂ O 中の0.05%TF A 移動相B ACN中の0.05%TFA	<table><tr><th>時間(分)</th><th>A%</th><th>B%</th></tr><tr><td>開始</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>11.0</td><td>65</td><td>35</td></tr><tr><td>13.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>15.0</td><td>5</td><td>95</td></tr><tr><td>16.0</td><td>95</td><td>5</td></tr><tr><td>20.0</td><td>95</td><td>5</td></tr></table>	時間(分)	A%	B%	開始	95	5	11.0	65	35	13.0	5	95	15.0	5	95	16.0	95	5	20.0	95	5	1.5 —— 45	20
時間(分)	A%	B%																									
開始	95	5																									
11.0	65	35																									
13.0	5	95																									
15.0	5	95																									
16.0	95	5																									
20.0	95	5																									

10

20

【0238】

分析SFC

SFC法の一般的手順

二酸化炭素（CO₂）を送達するためのバイナリポンプ及び改質剤によって構成される分析超臨界流体クロマトグラフィ（SFC）システム、オートサンプラー、カラムオーブン、最大400バールに耐える高圧フローセルを備えたダイオードアレイ検出器を使用してSFC測定を実行した。分析SFCの詳細を以下の表3に示す。質量分析計（MS）と構成された場合、カラムからの流れは（MS）にもたらされた。化合物の公称モノアイソトピック分子量（MW）の同定を可能にするイオンを得るために、調整パラメータ（例えば、走査範囲、滞留時間など）を設定することは、当業者の知識の範囲内である。適切なソフトウェアでデータ収集を実行した。

30

【0239】

【表 3】

表 3：分析SFC法（流れはmL／分で、℃で表されるカラム温度（T）；ランタイムは分で、バール単位の背圧（BPR）又はポンド重／平方インチ（psi）で表す。「ACN」はアセトニトリルを意味し、「MeOH」はメタノールを意味し、「EtOH」はエタノールを意味し、「DEA」はジエチルアミンを意味する。以下の表で使用される他の全ての略語は、前に定義したとおりである）

40

方法コード	カラム	移動相	勾配	流量	ランタイム
				Col T	BPR
11	PDAを有するWaters UPCC (Chiralpak IG-3内径100×4.6mm、3μm)	A: 超臨界CO ₂ B: EtOH (0.05%DEA)	5%～40%のBを4分保持し、40%を2.5分間保持し、次いで5%のBを1.5分間保持	2.8	8
				35	1500psi

50

【0240】

結晶形態中間体234b

結晶形態の中間体234bは、X線粉末回折パターンによって特徴付けることができる。

【0241】

PANalytical Aeris回折計でX線粉末回折(XRPD)分析を行った。この装置は、入射ビーム及び回折ビームにそれぞれiCore及びdCore可変光学系を使用するCu-K α X線管を備えている。化合物を、バックローディング技術を使用して16mmのサンプルホルダーの空洞にロードした。

【0242】

以下の方法を用いて、試料をXRPDに供した：

管：Cu：K- α ($\lambda = 1.541874 \text{ \AA}$)

発生器：電圧：45kV電流：15mA

ジオメトリ：Bragg-Brentano

走査様式：連続走査

走査範囲：4～50度

ステップサイズ：0.0217度

カウント時間：58s

スピナー回転時間：1秒

入射ビーム経路(iCore)

発散スリット：1/4°

ソーラスリット：0.04rad

マスク1：9mm

回折ビーム経路(dCore)

散乱防止スリット：9mm

照射長：10mm

ソーラスリット：0.04rad

検出器：PIXcel3D-Medipix3 1x1

【0243】

当業者は、回折パターン及びピーク位置が、典型的には、使用される回折計とは実質的に無関係であり、特定の較正方法を利用するかどうかを認識するであろう。典型的には、ピーク位置は、約 $\pm 0.2^\circ$ 2シータ以下だけ異なり得る。特定の回折ピークのそれぞれの強度(及び相対強度)はまた、以下に限定されないが、粒子サイズ、配向、試料純度などを含めた様々な要因の関数に応じて、変動することがある。

【0244】

X線粉末回折パターンは、5.82、10.09及び18.42度の2シータ ± 0.2 度の2シータにピークを含む。

【0245】

X線粉末回折パターンは、5.82、8.52、9.20、10.09、11.43、13.61、14.94、15.89、17.03及び18.42度の2シータ ± 0.2 度の2シータにピークを含む。

【0246】

中間体234bは、それらのピークから選択される4つ、5つ、6つ、7つ、8つ、9つ又はそれ以上のピークを有するX線粉末回折パターンによって更に特徴付けられ得る。

【0247】

中間体234bは、実質的に図4に示すX線粉末回折パターンによって更に特徴付けられ得る。

【0248】

結晶形態A

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(

10

20

30

40

50

(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aは、X線粉末回折パターンによってキャラクタライズすることができる。

【0249】

PANalytical Empyrean回折計でX線粉末回折(XRPD)分析を行った。この装置は、入射ビーム及び回折ビームにそれぞれiCore及びdCore可変光学系を使用するCu-K α X線管を備えている。化合物を、バックローディング技術を使用して16mmのサンプルホルダーの空洞にロードした。

【0250】

以下の方法を用いて、試料をXRPDに供した：

管：Cu：K- α ($\lambda = 1.541874 \text{ \AA}$)

発生器：電圧：45kV電流：40mA

ジオメトリ：Bragg-Brentano

走査様式：連続走査

走査範囲：3~35度

工程サイズ：0.0131度

カウント時間：30s

スピナー回転時間：1秒

入射ビーム経路(iCore)

プログラム 発散スリット：自動

照射長：10mm

ソーラスリット：0.03rad

マスク1：14mm

マスク2：6mm

幅：7.7mm

回折ビーム経路(dCore)

散乱防止スリット：自動

照射長：10mm

ソーラスリット：0.04rad

検出器：PIXcel3D-Medipix3 1x1

【0251】

当業者は、回折パターン及びピーク位置が、典型的には、使用される回折計とは実質的に無関係であり、特定の較正方法を利用するかどうかを認識するであろう。典型的には、ピーク位置は、約 $\pm 0.2^\circ$ 2シータ以下だけ異なり得る。特定の回折ピークのそれぞれの強度(及び相対強度)はまた、以下に限定されないが、粒子サイズ、配向、試料純度などを含めた様々な要因の関数に応じて、変動することがある。

【0252】

X線粉末回折パターンは、5.4、7.2、11.1、11.9及び21.7度の2シータ ± 0.2 度の2シータにピークを含む。X線粉末回折パターンは、13.7、14.5、14.7、15.0、16.5、17.8、19.0、19.4、20.1度2シータ ± 0.2 度2シータから選択される少なくとも1つのピークを更に含み得る。

【0253】

形態Aは、更に、表4で特定されるピークから選択される4、5、6、7、8、9個又はそれ以上のピークを有するX線粉末回折パターンによってキャラクタライズし得る。

【0254】

形態Aは、更に表4で特定されるピークを含むX線粉末回折パターンによってキャラクタライズし得、ピークの相対強度は、約2%超、好ましくは約5%超、より好ましくは約10%超、より好ましくは約15%超である。しかしながら、当業者は、ピークの相対強度が、異なる試料相互間で、また同じ試料の異なる測定値相互間で異なり得ることを理解

10

20

30

40

50

するであろう。

【0255】

形態Aは、更に、実質的に図1に示すX線粉末回折パターンによってキャラクタライズし得る。

【0256】

表4は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物(図1)の結晶形態AのXRPDについてのピークリスト及び相対強度を示す。

【0257】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4 :

位置[° 2Th.]	Rel. 強度[%]	
5. 3965	16. 30	
7. 1906	23. 69	
9. 2513	8. 14	
9. 4433	7. 39	
11. 0719	11. 34	
11. 9144	73. 29	
12. 3921	29. 17	
12. 5717	22. 93	10
12. 8791	8. 93	
13. 6790	26. 58	
13. 8694	15. 67	
14. 4793	38. 19	
14. 7398	55. 26	
14. 9599	56. 99	
15. 8715	20. 66	
16. 4606	22. 37	
17. 0459	20. 43	
17. 4421	34. 59	
17. 8203	46. 78	
18. 2871	30. 73	20
18. 9573	43. 91	
19. 4485	41. 00	
20. 1190	35. 53	
20. 7356	18. 05	
21. 0535	30. 09	
21. 6801	100. 00	
22. 0236	18. 06	
22. 7925	29. 92	
23. 5044	41. 92	
23. 9959	43. 96	
24. 5555	31. 47	
25. 1401	25. 01	30
25. 7588	59. 24	
26. 0910	53. 05	
26. 6137	39. 47	
27. 5409	24. 89	
28. 5493	22. 44	
29. 1699	13. 97	
30. 1441	21. 01	
31. 2560	14. 66	
31. 8783	16. 47	
32. 7054	17. 11	
33. 2797	24. 40	
33. 9762	15. 63	40

【0258】

薬理学

本発明の化合物は、メニンとMLLタンパク質及び発がん性MLL融合タンパク質との相互作用を遮断することが見出された。したがって、本発明による化合物及びかかる化合物を含む医薬組成物は、疾患、例えば、限定するものではないが、白血病、骨髓異形成症候群（MDS）、及び骨髓増殖性腫瘍（MPN）などのがん及び糖尿病の治療又は予防、特に治療に有用であり得る。

【0259】

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、がんの治療又は予防に有用であり得

10

20

30

40

50

る。一実施形態によれば、本発明のメニン／M L L阻害剤による治療から恩恵を受け得るがんは、白血病、リンパ腫、骨髄腫又は固形腫瘍がん（例えば、前立腺がん、肺がん、乳がん、膵臓がん、結腸がん、肝臓がん、黒色腫及び神経膠芽腫など）を含む。いくつかの実施形態では、白血病には、急性白血病、慢性白血病、骨髄球性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病（A M L）、慢性骨髄性白血病（C M L）、急性リンパ芽球性白血病（A L L）、慢性リンパ球性白血病（C L L）、T細胞前リンパ球性白血病（T－P L L）、大顆粒リンパ球性白血病、有毛細胞白血病（H C L）、M L L再構成白血病、M L L－P T D白血病、M L L増幅白血病、M L L陽性白血病、H O X／M E I S 1遺伝子発現シグネチャを示す白血病などが含まれる。

【0260】

10

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、骨髄異形成症候群（M D S）又は骨髄増殖性腫瘍（M P N）の治療又は予防に有用であり得る。

【0261】

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、白血病、特にヌクレオフォスミン（N P M 1）変異型白血病、例えば、N P M 1 cの治療又は予防に有用であり得る。

【0262】

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、A M L、特にヌクレオフォスミン（N P M 1）変異A M L（すなわち、N P M 1^{mut} A M L）、より詳細には、抽象N P M 1変異A M Lの治療又は予防に有用であり得る。

【0263】

20

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、M L L再構成白血病、特にM L L再構成A M L又はA L Lの治療又は予防に有用であり得る。

【0264】

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、M L L遺伝子変化を伴う白血病、特にM L L遺伝子変化を伴うA M L又はA L Lの治療又は予防に有用であり得る。

【0265】

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、Q . D .投薬（1日1回）に適切であり得る。

【0266】

特に、本発明による化合物及びその医薬組成物は、N P M 1遺伝子変異及び／又は混合系統白血病遺伝子（M L L、M L L 1、K M T 2 A）変化、混合型白血病（M L L）、M L L関連白血病、M L L関連白血病、M L L陽性白血病、M L L誘発性白血病、再構成された混合型白血病、M L Lに関連する白血病、M L L遺伝子の再構成／変化又は再構成／変化、急性白血病、慢性白血病、骨髄異形成症候群（M D S）、骨髄増殖性腫瘍（M P N）、インスリン抵抗性、糖尿病前症、糖尿病、又は糖尿病のリスク、高血糖、染色体11 q 23上の染色体再構成、1型糖尿病、2型糖尿病、を示す対象における血液がんの治療又は予防に有用であり得、それは膵臓細胞の増殖を促進し、ここで、膵臓細胞は、膵島細胞であるベータ細胞であり、ベータ細胞増殖は、ベータ細胞産生又はインスリン産生の増加によって証明され、それはメニン－M L L相互作用を阻害するためのものであって、M L L融合タンパク質標的遺伝子はヒトにおいてはH O X又はM E I S 1である。

30

【0267】

したがって、本発明は、医薬品として使用するための本発明の化合物に関する。

【0268】

本発明はまた、医薬品の製造のための、本発明の化合物の使用に関する。

【0269】

本発明はまた、ヒトを含む哺乳動物におけるメニンとM L Lタンパク質及び発がん性M L L融合タンパク質との相互作用に関連する障害の治療、予防、改善、制御又はリスクの低減に使用するための、本発明による化合物又は本発明による医薬組成物に関し、その治療又は予防は、メニンとM L Lタンパク質及び発がん性M L L融合タンパク質との相互作用をブロックすることによって影響を受けるか又は促進される。

40

50

【0270】

また、本発明は、ヒトを含む哺乳動物におけるメニンとM L Lタンパク質及び発がん性M L L融合タンパク質との相互作用に関連する障害の治療、予防、改善、制御又はリスク低減のための医薬品の製造のための、本発明による化合物の使用に関し、その治療又は予防は、メニンとM L Lタンパク質及び発がん性M L L融合タンパク質との相互作用をブロックすることによって影響を受けるか又は促進される。

【0271】

本発明はまた、前述の疾患のいずれか1つの治療又は予防に使用するための、本発明による化合物に関する。

【0272】

本発明はまた、前述の疾患のいずれか1つを治療又は予防する際に使用するための、本発明による化合物に関する。

【0273】

本発明はまた、前述の疾患状態のいずれか1つを治療又は予防するための医薬品の製造のための、本発明による化合物の使用に関する。

【0274】

本発明の化合物は、前述の疾患のいずれか1つの治療又は予防のために、哺乳動物、好ましくはヒトに投与することができる。

【0275】

本発明による化合物の有用性を考慮して、前述の疾患のいずれか1つに罹患しているヒトを含む温血動物を治療する方法が提供される。

【0276】

上記方法は、治療有効量の本発明による化合物の、ヒトを含む温血動物への投与、すなわち全身投与又は局所投与を含む。

【0277】

したがって、本発明はまた、治療有効量の本発明による化合物を、それを必要とする患者に投与することを含む、前述の疾患のいずれか1つを治療又は予防する方法に関する。

【0278】

当業者は、治療有効量の本発明の化合物が治療活性を有するのに十分な量であり、この量がとりわけ、疾患の種類、治療製剤中の化合物の濃度、及び患者の状態によって変化することを理解するであろう。有効な治療1日量は、約0.005mg/kg～100mg/kgであり得る。治療効果を達成するために必要とされる、本明細書において有効成分とも呼ばれる本発明による化合物の量は、例えば、特定の化合物、投与経路、レシピエントの年齢及び状態、並びに治療される特定の障害又は疾患により、個々の場合に依りて異なり得る。治療方法はまた、1日当たり1～4回の摂取量のレジメンで有効成分を投与することを含み得る。これらの治療方法では、本発明による化合物は、好ましくは投与前に製剤化される。

【0279】

本発明はまた、本明細書で言及される障害を予防又は治療するための組成物を提供する。上記組成物は、治療有効量の本発明による化合物、及び医薬的に許容される担体又は希釈剤を含む。

【0280】

有効成分は単独で投与することも可能であるが、医薬組成物として与えることが好ましい。したがって、本発明は更に、医薬的に許容される担体又は希釈剤と共に、本発明による化合物を含む医薬組成物を提供する。担体又は希釈剤は、組成物の他の成分と適合性があり、かつそのレシピエントに有害ではないという意味で「許容される」ものでなければならない。

【0281】

医薬組成物は、例えば、Gennaro et al. Remington's Pharmaceutical Sciences (18th ed., Mack Publi

10

20

30

40

50

shing Company, 1990、特に、Part 8: Pharmaceutical preparations and their Manufactureを参照されたい)に記載されているものなどの方法を使用して、薬学の分野で周知の任意の方法によって調製することができる。

【0282】

本発明の化合物は、単独で、又は1つ以上の追加の治療剤と組み合わせて使用することができる。併用療法には、本発明による化合物及び1つ以上の追加の治療剤を含有する単一の薬剤投与製剤を投与すること、並びに本発明による化合物及び各追加の治療剤をそれ自身の別個の薬剤投与製剤で投与することを含む。

【0283】

したがって、本発明の一実施形態は、第1の有効成分としての本発明による化合物と、更なる有効成分としての1つ以上の抗がん剤とを、がん罹患している患者の治療において同時に、又は別々に、又は逐次的に使用するための組み合わせ調製物として含む製品に関する。

【0284】

1つ以上の他の薬剤及び本発明による化合物は、同時に（例えば、別個に、又は単一の組成物で）、又はいずれかの順序で逐次的に投与することができる。後者の場合、2つ以上の化合物は、有利な又は相乗的な効果が達成されることを確実にするのに十分な期間内及び量及び方法で投与される。組み合わせの各成分のための、好ましい投与の方法及び順序並びにそれぞれの投与量及びレジームは、投与される特定の他の医薬品及び本発明の化合物、それらの投与経路、治療される特定の状態、特に腫瘍、並びに処置される特定の宿主に依存することが理解されるであろう。

【0285】

薬理試験

以下に記載される薬理試験では、以下の化合物について説明する。化合物A：(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)-アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)-ベンズアミド、

化合物A1：(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)-アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)-ベンズアミド・2HCl・xH₂O (x=2~3)、

化合物A3：(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)-アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)-ベンズアミドオキサレート塩。

化合物A4：(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)-アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態A

これらの薬理試験からの結果は、(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)-アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)-ベンズアミドの生物学的活性を明確に示している。

【0286】

1) メニン/MLL均一時間分解蛍光(HTRF)アッセイ

未処理の白色384ウェルマイクロタイタープレートに、DMSO中40nLの200X試験化合物及びアッセイ緩衝液(40mM Tris・HCl、pH7.5、50mM

10

20

30

40

50

NaCl、1mM DTT（ジチオスレイトール）及び0.05%Pluronic F-127）中4μLの2Xテルビウムキレート標識メニン（調製については以下参照）を添加した。試験化合物及びテルビウムキレート標識メニンを周囲温度で30分間インキュベートした後、アッセイ緩衝液中の4μLの2X FITC-MBM 1ペプチド（FITC-β-アラニン-SARWRFPARPGT-NH₂）（「FITC」はフルオレセインイソチオシアネートを意味する）を添加し、マイクロタイタープレートで1000rpmで1分間遠心分離し、アッセイ混合物を周囲温度で15分間インキュベートした。アッセイ混合物中に存在するメニンFITC-MBM1複合体の相対量は、テルビウム/FITCドナー/アクセプター蛍光団ペアの均一時間分解蛍光（HTRF）を、EnVisionマイクロプレートリーダー（励起337nm/テルビウム蛍光490nm/FITC蛍光520nm）を周囲温度で使用して測定することにより求められる。蛍光共鳴エネルギー移動の程度（HTRF値）は、FITCとテルビウムフルオロフォアの蛍光発光強度の比（ $F^{em}520nm/F^{em}490nm$ ）として表される。結合アッセイにおける試薬の最終濃度は、アッセイ緩衝液中200pMテルビウムキレート標識メニン、75nM FITC-MBM1ペプチド及び0.5%DMSOである。試験化合物の用量応答滴定は、11点、四倍段階希釈スキームを用いて行い、典型的には10μMから開始する。

【0287】

化合物の有効性を、まず、式1に従って各化合物濃度における阻害%を計算することによって調べた。

$$\text{阻害\%} = ((HC - LC) - (HTRF_{\text{化合物}} - LC)) / (HC - LC) * 100$$

（式1）

式中、LC及びHCは、メニンへの結合についてFITC-MBM1と競合する化合物の飽和濃度の存在下又は非存在下におけるアッセイのHTRF値であり、HTRF化合物は、試験化合物の存在下における測定されたHTRF値である。HC及びLC HTRF値は、1プレート当たり少なくとも10回の反復の平均を表す。各試験化合物について、阻害%値を試験化合物濃度の対数に対してプロットし、これらのデータを式2に当てはめることから得られたIC₅₀値をプロットした。

$$\text{阻害\%} = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{-(\log IC_{50} - \log [cmpd]) * h}) \quad (\text{式2})$$

式中、Bottom及びTopはそれぞれ用量反応曲線の下側及び上側の漸近線であり、IC₅₀はシグナルの50%阻害をもたらす化合物の濃度であり、hはヒル係数である。

【0288】

メニンのテルビウムクリプテート標識の調製：メニン（a.a1-610-6xhisタグ、20mM Hepes（2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸）中2.3mg/mL、80mM NaCl、5mM DTT（ジチオスレイトール）、pH7.5）をテルビウムクリプテートで以下のように標識した。200μgのメニンを1xHepes緩衝液に緩衝液交換した。6.67μMのメニンを、8倍モル過剰のNHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）-テルビウムクリプテートと室温で40分間インキュベートした。溶出緩衝液（0.1M Hepes、pH7+0.1%BSA（ウシ血清アルブミン））を用いてNAP5カラムで反応を実行することによって、標識タンパク質の半分を遊離標識から精製した。残りの半分を0.1Mリン酸緩衝生理食塩水（PBS）、pH7で溶出した。400μLの溶離液をそれぞれ回収し、等分し、-80℃で凍結した。テルビウム標識メニンタンパク質の最終濃度は、それぞれHepes緩衝液中で115μg/mL、PBS緩衝液中で85μg/mLであった。

【0289】

メニンタンパク質配列（配列番号1）：

MGLKAAQKTLFPLRSIDDDVVRLLFAAE LGREEPDLVLLSL
VLGFVEHFLLAVNRVIPTNVPELTFQPSPAPDPPGGLTYFP
VADLSIIAALYARFTAQIRGAVDLSLYPREGGVSSRELVK

KVSDVIWNSLSRSYFKDRAHIQSLSFSFITGTKLDS SSGVAF
AVVGACQALGLRDVHLALS EDHAWVVF GPNGEQTAEVTWH
GKGNE DRRGQTVNAGVAERSWLYLKGSYMRCDRKMEVAFM
VCAINPSIDLHTDSLELLQLQQKLWL LYDLGHLERYPMA
LGNLADLEELEPTPGRPDPLTLYHKGIASAKTYRDEHIY
PYMYLAGYHCRNRNVREALQAWADTATVIQDYN YCREDEE
IYKEFFE VANDVIPNLLKEAASLLEAGEERPGEQSQGTQS
QGSALQDPECFAHL LRFYDGICKWEEGSP TPVLHV GWATF
LVQSLGRFEGQVRQKVRIVSREAEAAEAEEPWGEEAREGR
RRGPRRESKPEEPPPPK KPALDKGLGTGQGAVSGPPRKPP
GTVAGTARGPEGGSTAQVPAPAA SPPPEGPVLT FQSEKMK
GMKELLVATKINSSAIKLQLTAQS QVQMKKQKVSTPSDYT
LSFLKRQRKGLHHHHHHH

【0290】

2a) 増殖アッセイ

メニン／MLLタンパク質／タンパク質相互作用阻害剤試験化合物の抗増殖効果を、ヒト白血病細胞株において評価した。細胞株MOLM-14は、MLL転座を有し、それぞれMLL融合タンパク質MLL-AF9及び第2の対立遺伝子由来の野生型タンパク質を発現する。NPM1c遺伝子変異を有するOCIE-AML3細胞についても試験した。MLL再構成細胞株（例えば、MOLM-14）及びNPM1c変異細胞株は、幹細胞様のHOXA／MEIS1遺伝子発現シグネチャを示す。一般的な細胞毒性効果を示す化合物を排除するために、KO-52を2つのMLL（KMT2A）野生型対立遺伝子を含む対照細胞株として使用した。

【0291】

MOLM-14細胞を、10%熱不活性化ウシ胎児血清（HyClone）、2mM L-グルタミン（Sigma Aldrich）及び50µg/mLゲンタマイシン（Gibco）を補充したRPMI-1640（Sigma Aldrich）で培養した。KO-52及びOCIE-AML3細胞株を、20%熱不活性化ウシ胎児血清（HyClone）、2mM L-グルタミン（Sigma Aldrich）及び50µg/mLゲンタマイシン（Gibco）を補充したアルファ-MEM（Sigma Aldrich）で増殖させた。細胞を培養中に0.3~250万細胞/mLに維持し、継代数は20を超えなかった。

【0292】

抗増殖効果を評価するために、200個のMOLM-14細胞、200個のOCIE-AML3細胞又は300個のKO-52細胞を、96ウェル丸底超低接着プレート（Costar、カタログ番号7007）中の200µL培地／ウェルに播種した。細胞播種数は、実験全体を通して線形増殖を確実にするために増殖曲線に基づいて選択した。試験化合物を異なる濃度で添加し、DMSO含有量を0.3%に正規化した。細胞を37℃及び5%CO₂で8日間インキュベートした。スフェロイド様増殖を、8日目に画像を取得する生細胞イメージング（Incucyte ZOOM、Essenbio、4倍の対物レンズ）によってリアルタイムで測定した。スフェロイドサイズの尺度としてのコンフルエンス（%）を、統合解析ツールを使用して決定した。

【0293】

試験化合物の効果を経時的に求めるために、各ウェルにおけるスフェロイドサイズの尺度としてのコンフルエンスを計算した。参照化合物の最高用量のコンフルエンスをLCのベースライン（低対照）として使用し、DMSO処理細胞のコンフルエンスを0%細胞傷害性（高対照、HC）として使用した。

【0294】

絶対IC₅₀値を、コンフルエンスのパーセント変化として以下のように計算した。

LC = 低対照：例えば、1µMの細胞傷害剤スタウロスポリンで処理した細胞、又は、

10

20

30

40

50

例えば、高濃度の代替基準化合物で処理した細胞；

HC = 高対照：平均コンフルエンス（％）（DMSO処理細胞）；

効果％＝ $100 - (100 * (\text{試料} - \text{LC}) / (\text{HC} - \text{LC}))$ ；及び

GraphPad Prism（バージョン7.00）を使用してIC₅₀を計算した。用量応答方程式を、可変勾配を用い、最大値を100％に固定し、最小値を0％に固定して、効果％対Log₁₀化合物濃度のプロットに使用した。

【0295】

2b) MEIS1 mRNA発現アッセイ

化合物処理時のMEIS1 mRNA発現を、Quantigene Singleplexアッセイ（Thermo Fisher Scientific）によって調べた。この技術は、目的の定義された標的配列にハイブリダイズするプローブを使用してmRNA標的の直接定量を可能にし、マルチモードプレートリーダーEnvision（PerkinElmer）を使用してシグナルを検出する。MOLM-14細胞株をこの実験に使用した。細胞を、増加する濃度の化合物の存在下、96ウェルプレートに3,750細胞／ウェルで播種した。化合物と48時間インキュベートした後、細胞を溶解緩衝液中で溶解し、55℃で45分間インキュベートした。細胞溶解物を、正常化対照としてのヒトMEIS1特異的捕捉プローブ又はヒトRPL28（リボソームタンパク質L28）特異的プローブ、並びにブロッキングプローブと混合した。次いで、細胞溶解物をカスタムアッセイハイブリダイゼーションプレート（Thermo Fisher Scientific）に移し、55℃で18～22時間インキュベートした。その後、プレートを洗浄して未結合物質を除去した後、前置増幅剤、増幅剤及び標識プローブを順次加えた。シグナル（＝遺伝子カウント）をマルチモードプレートリーダーEnvisionで測定した。IC₅₀を、適切なソフトウェアを使用した用量応答モデリングによって計算した。全ての非ハウスキーバ遺伝子について、応答は、バックグラウンド及び相対発現について補正されたカウントに等しい。各試料について、各試験遺伝子シグナル（バックグラウンドを差し引いたもの）を正規化遺伝子シグナル（RPL28：バックグラウンドを差し引いたもの）で割った。処理された試料の正規化された値をDMSO処理された試料の正規化された値で割ることによって、倍率変化を計算した。各標的遺伝子の倍率変化をIC₅₀の計算に使用した。

【0296】

結果を以下の表5にまとめる。

【0297】

【表5】

表5－生物学的データ－HTRF、増殖及びMEIS1 mRNA発現アッセイ

化合物番号	HTRF-30分 インキュベーション IC ₅₀ (nM)	MEIS1 IC ₅₀ (μM)	スフェロイドアッセイ— OneTime MOLM- 14 IC ₅₀ (μM)	OCI-AM L3 IC ₅₀ (μM)	スフェロイドアッセイ —OneTime KO- 52 IC ₅₀ (μM)
A	0.09	0.02	0.021	0.091	6.85
A3	0.098	0.017	0.017	0.12	7.75
A1	0.18	0.017	0.011	0.08	
A4		0.011	0.008	0.019	5.44

【0298】

3) マウスPK（インビボT_{1/2}及び経口バイオアベイラビリティ）

絶食させた雄性CD-1マウス（6～8週齢）にHP-β-CD20％（w：vol）溶液又はパイロジェンフリー水に製剤化された試験物質を、静脈内投与（0.5又は1.0mg／kgを2.5mL／kgで静脈内投与）又は経口投与（5mg／kgを10mL溶液／kgで経口投与）した後のインビボ薬物動態（PK）を評価した。

【0299】

抗凝固剤としてEDTAを使用して、連続キャピラリーマイクロサンプリング（約0.03mL）によって所望の時点で背側中足静脈から血漿及び／又は全血試料を採取した。

血漿及び血液試料中の化合物の濃度を、適格な LC-MS/MS 法を用いて分析した。WinNonlin (Phoenix (商標)、バージョン 6.1) 又は同様のソフトウェアを使用して、主な薬物動態パラメータのインシリコ分析を行った。

【0300】

4) ヒト/マウス肝臓ミクロソームにおける代謝安定性

実験手順

この実験の目的は、ヒト及びマウスの肝臓ミクロソームにおける試験化合物のインビトロ代謝安定性を測定し、代謝回転速度に関する定量的情報を提供すること（すなわち、試験の見かけの固有クリアランスを決定すること）である。

【0301】

DMSO 中 10 mM のストック濃度で試験項目を調製した。代謝ターンオーバーを調べるために、試験化合物又は陽性対照化合物用の 2 µL の 10 mM DMSO 原液を 198 µL のアセトニトリルに添加することによって最終作業溶液を調製した（最終濃度 100 µM）。

【0302】

インキュベーションを以下のように行った。最初に、肝臓ミクロソームを氷上で解凍し、100 mM PBS (リン酸緩衝生理食塩水) 中に肝臓ミクロソームを含有する pH 7.4 のマスター溶液を調製する。次に、肝臓ミクロソーム溶液をインキュベーションプレートに加え、10 mM NADPH (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸) を加えた (MW: 833.4 g/mol, Roche Diagnostics GmbH、ドイツ。リン酸緩衝液 (100 mmol/L、pH 7.4) に溶解)。混合物を 10 秒間混合し、インキュベーションプレートにおいて 37 °C で 10 分間予熱した。° 試験化合物又は陽性対照化合物の 100 µM 作業溶液 5 µL をインキュベーションプレートに添加して代謝反応を開始した（最終試験項目の濃度 = 1 µM）。反応最終混合物には、pH 7.4 の 100 mM PBS 中に 1 mM NADPH、0.5 mg/mL ミクロソームタンパク質及び 1 µM 試験化合物又は陽性対照化合物を含有させる必要がある。インキュベーション混合物中の有機溶媒のパーセンテージは 1 % であり、DMSO ≤ 0.02 % である。

【0303】

選択した時点でインキュベートした混合物 50 µL を、冷メタノール 200 µL を含有するクエンチプレートに移すことによって、反応をクエンチした。全ての時点のサンプリングを終えた後、クエンチプレートを 4000 rpm で 40 分間遠心分離してタンパク質を沈殿させた。合計 90 µL の上清を分析プレートに移し、LC/MS/MS 分析のために超純 H₂O 水を各ウェルに添加した。全てのインキュベーション及び分析を 2 連で行った。

【0304】

データ分析

全ての計算は、Microsoft Excel を使用して行った。勾配値 k は、親薬物の残存パーセンテージ対インキュベーション時間曲線の自然対数の線形回帰によって求めた。結果を以下の表 6 にまとめる。

【0305】

インビトロ半減期 (インビトロ $t_{1/2}$) を勾配値から求めた。

インビトロ $t_{1/2} = - (0.693 / k)$

インビトロ $t_{1/2}$ (分) のインビトロ固有クリアランス (*in vitro* Cl_{int} 、µL/分/mg タンパク質単位) への変換は、以下の式を使用して行った。

【0306】

【数 2】

$$in\ vitro\ Cl_{int} = \left(\frac{0.693}{t_{1/2}} \right) * \left(\frac{\text{インキュベーションの体積}(\mu\text{L})}{\text{タンパク質の量}(\text{mg})} \right)$$

10

20

30

40

50

【0307】

【表6】

表6－マウスPK及び代謝安定性

実施例番号	製剤化剤	インビボ $T_{1/2}$ (IV)(h)	バイオアベイラビ リティ(PO)(%)	ヒトLMクライ アント(μ l/分/ mg)	マウスLMクラ イアント(μ l/ 分/mg)
A	HP- β -CD	6.7	17	19	<7.5
A3	パイロジェンフ リー水	9.0	34	19	<7.5
11	HP- β -CD	NA	NA	14	<7.5

10

「NA」は分析しなかったことを意味する

【0308】

5) MOLM-14又はOCI-AML3細胞の皮下(s.c又はS.C)異種移植片における薬力学(PD)活性のためのプロトコル

試験薬剤及び対照

化合物A3を20%ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン(HP- β -CD)に製剤化し、動物20gについて1用量当たり0.2mL(10mL/kg)の総体積に達するように調製した。用量は、毎日個々の体重によって調整した。化合物A3の作業用ストックを各実験用に週に1回調製し、室温で保存した。化合物A3を経口(PO)で毎日投与した。

20

【0309】

アッセイ

化合物のインビボ薬力学(PD)活性を、MOLM-14細胞又はOCI-AML3細胞の皮下(S.C)異種移植片において評価した。MOLM-14又はOCI-AML3腫瘍を有するヌードNMRIマウス(CrL:NMRI-Foxn1nu/-)を1日3回のビヒクル又は化合物で処置した。血漿試料を、2日目投与の23時間後、最終投与の0.5時間後及び最終投与の16時間後に採取し、腫瘍試料を最終投与の16時間後に採取した。複数のメニン-MLL標的遺伝子(例えば、MEIS1、MEF2C、FLT3)の発現に対する化合物の効果を調べるために、Quantigene Plex技術(Thermo Fisher Scientific)を使用した。凍結腫瘍をホモジナイズし、溶解緩衝液中の個々の溶解マトリックスチューブに移し、55℃で30分間インキュベートした。細胞溶解物を標的特異的捕捉プローブ、Luminexビーズ及びブロッキングプローブと混合し、カスタムアッセイハイブリダイゼーションプレート(Thermo Fisher Scientific)に移し、54℃で18~22時間インキュベートした。その後、プレートを磁気分離プレートに移し、洗浄してビーズから未結合物質を除去し、引き続いて前置増幅剤、増幅剤及び標識プローブからなる連続ハイブリダイゼーション及びその後のストレプトアビジンフィコエリトリン結合を行った。ビーズからのシグナルをLuminex FlexMap三次元機器で測定した。全ての非ハウスキーパ遺伝子について、応答は、バックグラウンド及び相対発現について補正されたカウントに等しい。各試料について、各試験遺伝子シグナル(バックグラウンドを差し引いたもの)を正規化遺伝子シグナル(RPL19、RPL28、ATP6V1A、バックグラウンドを差し引いたもの)で割った。処理された試料の正規化された値をDMSO処理された試料の正規化された値で割ることによって、倍率変化を計算した。結果を以下の表7及び表8にまとめる。

30

40

【0310】

50

【表 7】

表 7－MOLM－14 SCモデルから選択された遺伝子の発現レベル（ビヒクルに対する％）（平均値及び標準偏差）

化合物A3 (mg/kg)	MEIS1	FLT3	MEF2C
0	101.30±15.06	104.80±10.07	103.50±11.02
3	83.49±25.48	78.67±20.74	85.50±22.77
10	62.84±4.06	74.91±8.97	68.04±14.43
30	23.16±2.75	52.61±4.51	27.83±2.17
50	14.40±3.39	36.14±3.50	18.75±2.38
100	10.97±3.21	35.82±1.10	14.18±1.56

10

【0311】

【表 8】

表 8－OCI－AML3 SCモデルから選択された遺伝子の発現レベル（ビヒクルに対する％）（平均値及び標準偏差）。

化合物A3 (mg/kg)	MEIS1
0	100.30±8.53
3	87.90±39.75
10	48.81±15.30
30	32.66±3.71
50	23.83±1.34
100	16.76±1.92

20

【0312】

表 7 a 及び表 8 a は、新鮮な腫瘍試料を用いた最適化された条件での反復実験に基づく中央値を示す。

【0313】

【表 9】

表 7 a－MOLM－14 SCモデルから選択された遺伝子の発現レベル（ビヒクルに対する％）（中央値及び標準偏差）。

化合物A3 (mg/kg)	MEIS1	FLT3	MEF2C
0	100.0±13.5	100.0±10.1	100.0±11.0
3	83.7±22.8	89.2±20.7	87.7±22.8
10	49.3±5.9	79.8±9.0	64.6±14.4
30	14.7±3.9	54.5±4.5	28.8±2.2
50	4.7±1.1	37.6±3.5	18.8±2.4
100	3.3±1.4	35.4±1.1	13.6±1.6

30

40

【0314】

50

【表 1 0】

表 8 a－O C I－A M L 3 S Cモデルから選択された遺伝子の発現レベル（ビヒクルに対する％）（中央値及び標準偏差）。

化合物A3 (mg/kg)	MEIS1
0	100.0±11.2
3	71.2±15.1
10	26.5±4.3
30	25.1±11.2
50	8.5±2.2
100	9.4±1.2

10

【0 3 1 5】

6）M O L M－1 4皮下モデルにおける有効性実験

試験薬剤及び対照

化合物 A 3 を 2 0 % ヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン（H P－β－C D）に製剤化し、動物 2 0 g について1用量当たり 0．2 m L（1 0 m L／k g）の総体積に達するように調製した。用量は、毎日個々の体重によって調整した。化合物 A 3 の作業用ストックを各実験用に週に 1 回調製し、2 5℃で保存した。

【0 3 1 6】

動物

雌 N M R I ヌードマウス（M O L M－1 4 S C）を、およそ 6 週齢～8 週齢であり、およそ 2 5 g の体重であるときに使用した。全ての動物は、実験的使用の前に最低 7 日間、あらゆる出荷関連ストレスに順応し、それから回復することができた。オートクレーブ処理した水及び照射食物を自由に与え、動物を 1 2 時間の明暗サイクルで維持した。ケージ、寝床、及び水筒を使用前にオートクレーブ処理し、毎週交換した。更なる詳細を以下の表 9 に示す。

20

【0 3 1 7】

【表 1 1】

表 9－組織培養及び細胞注入試薬

DPBS(ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水)
熱不活化ウシ胎児血清
RPMI 1640培地
L－グルタミン
ゲンタマイシン
T175培養フラスコ
ローラボトル

30

【0 3 1 8】

腫瘍モデル及び細胞培養方法

ヒト A M L 細胞 M O L M－1 4 を、示された完全培養培地（R P M I 1 6 4 0＋1 0 % H I－F B S＋2 m M L－グルタミン＋5 0 u g／m L ゲンタマイシン）中、3 7℃、5 % C O 2 で培養した。対数増殖の間に細胞を回収し、無血清培地中の冷（4℃）R o s w e l l P a r k M e m o r i a l I n s t i t u t e（R P M I）1 6 4 0 に再懸濁した。

40

【0 3 1 9】

各マウスの右脇腹に、1 c c シリンジ及び 2 7 ゲージ針を使用して 0．2 m L の総体積で、5 0 % M a t r i g e l 中 5×1 0⁶ 個の M O L M－1 4 細胞を投与した。

【0 3 2 0】

実験計画

化合物 A 3 を経口（P O）で毎日投与した。

50

【0321】

0日目は、腫瘍細胞移植及び実験開始の日である。

【0322】

SC MOLM-14腫瘍を有するマウスを腫瘍移植後16日目に無作為化し、腫瘍体積（平均約130mm³、n=10／群）に従って治療群に割り当てた。ビヒクル又は化合物A3（30及び100mg／kg）による治療を同日に開始し、21日間毎日経口投与した。PK（薬物動態）分析のために、最後の投与（n=4～5／群／時点）の1、2、4、8、及び23時間後に血漿を採取した。

【0323】

動物のモニタリング

SC腫瘍体積を、実験全体を通して週に2～3回又はそれ以上の回数、各動物について測定した。

【0324】

計算

腫瘍体積は、以下の式を使用して計算し、

腫瘍体積（mm³）=（D×d²／2）；式中、「D」はノギス測定によって測定される腫瘍の大きい方の直径を表し、「d」は小さい方の直径を表す。腫瘍体積データを平均腫瘍体積±SEMとしてグラフ化した。

【0325】

ΔTGI%を治療群と対照群の平均腫瘍負荷の差として定義し、 $\Delta TGI\% = \left(\frac{(TV_c - TV_t)}{TV_c} \right) \times 100$ （式中、「TV_c」は所与の対照群の平均腫瘍負荷であり、「TV_{c0}」は所与の対照群の平均初期腫瘍負荷であり、「TV_t」は治療群の平均腫瘍負荷であり、「TV_{t0}」は治療群の平均初期腫瘍負荷である）として計算した。TGI%を間の差として定義した。

【0326】

治療群及び対照群の平均腫瘍体積を以下のように計算した。

【0327】

$TGI\% = \left(\frac{(TV_c - TV_t)}{TV_c} \right) \times 100$ （式中、「TV_c」は対照群の平均腫瘍体積であり、「TV_t」は治療群の平均腫瘍体積である）。国立がん研究所の基準によって定義されるように、60%以上のTGIは生物学的に有意であるとみなされる。

【0328】

対照群とは無関係のベースラインと比較して処置に関連した腫瘍体積の減少を反映するように定量化された腫瘍退縮（TR）%は、 $TR\% = \left(\frac{(TV_{ti} - TV_{t0i})}{TV_{t0i}} \right) \times 100$ として計算され、式中、「TV_{ti}」は治療群の個々の動物の腫瘍負荷であり、「TV_{t0i}」は動物の初期腫瘍負荷である。

【0329】

データ解析

腫瘍体積を、Prismソフトウェア（GraphPadバージョン7又は8）を使用してグラフ化した。ほとんどの実験の統計的有意性を、2／3以上のマウスが各群に残っていた実験最終日に、HPβCDビヒクル処置対照と比較して、化合物A3治療群について評価した。p≤0.05のとき、群間の差異は有意であるとみなした。

【0330】

動物腫瘍体積の統計的有意性は、Rソフトウェアバージョン3.4.2（Janssenの内部開発Shinyアプリケーションバージョン4.0を使用）の線形混合効果（LME）分析を使用して計算し、処置及び時間を固定効果、動物をランダム効果とした。個々の縦方向応答軌跡が線形でない場合、対数変換を行った。

【0331】

このモデルから得られた情報を使用して、対照群の腫瘍体積又は全ての治療群間の腫瘍体積の対治療比較を行った。結果を図2に示す。

【0332】

10

20

30

40

50

7) Ca^{2+} 蛍光アッセイ (CTCM ヒト) を使用したヒト多能性幹細胞由来心筋細胞 (hSC-CM) の同期した拍動における試験化合物の心電生理学的効果

プロトコル

化合物を 96 ウェルプレートで試験した。

【0333】

Cor. 4U (登録商標) 心筋細胞又は iCell (登録商標) 心筋細胞 2 につき、化合物を、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.2 \mu\text{M}$ 、 $0.5 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $2.5 \mu\text{M}$ 及び $5 \mu\text{M}$ ($n = 4$ / 用量) で試験した。

【0334】

あるいは、主に iCell (登録商標) 心筋細胞 2 について、化合物を、 $0.1 \mu\text{M}$ 、 $0.3 \mu\text{M}$ 、 $1 \mu\text{M}$ 、 $3 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 及び $30 \mu\text{M}$ ($n = 4$ / 用量) で試験した。

【0335】

陽性対照及び陰性対照

3 nM のドフェチリド

100 nM のイソプロテレノール

$100 \sim 300 \text{ nM}$ のニモジピン

$3 \mu\text{M}$ のセチリジン。

【0336】

ビヒクル対照：ジメチルスルホキシド (DMSO)。DMSO 又はその溶媒中の化合物の溶液 (0.1% DMSO の最終濃度、 $n = 8$) 。

【0337】

試験物質及び対照の調製

試験した化合物を、意図する濃度の 1000 倍で DMSO に溶解した。試験化合物並びに陽性対照及び陰性対照を最終濃度の 1000 倍で含有する化合物「マザープレート」を作製した。実験日に、これらのストック溶液を、 10 mM HEPES (Gibco) を補充した Tyrode (Sigma) で、意図する濃度の 2 倍に (丸底化合物プレート中で) 希釈した。試験溶液及びビヒクル対照中の最終 DMSO 濃度は 0.1% であった。

【0338】

細胞

hSC-CM (Cor. 4U (登録商標) 心筋細胞) は、CDI (Ncardia、ドイツ) から入手した。細胞を予めプレティングし、単層を形成するのに適した密度でフィブロネクチン被覆 96 ウェルプレートに播種し、細胞供給元の説明書に従って、ステージインキュベーター (37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$) 内の培養物内に維持する。

【0339】

iCell (登録商標) 心筋細胞 2 と呼ばれる第二系統の hSC 由来心筋細胞を FUJIFILM Cellular Dynamics (米国) から購入した。試験薬物を用いた実験は、hiPSC 由来心筋細胞の生きた拍動する単層を有するように細胞をプレート上にプレティングした 5~7 日後に行われる。96 ウェルプレート中の拍動している単層を、通常、凍結した iCell (登録商標) 心筋細胞 2 (500 万細胞 / バイアル) の 2 バイアルから採取し、これを 3 つの 96 ウェルプレート (おおよそ 50 K / ウェル) にプレティングする。

【0340】

実験開始前

実験開始の少なくとも 1 時間前に、正常細胞培地をカルシウム色素を含む Tyrode 溶液で置き換えた (下記参照) 。

【0341】

Cal 520 色素 (AAT Bioquest) を、 10 mM HEPES を補充した 11 mL の Tyrode に溶解し、 37°C まで加温した後、細胞に添加した。

【0342】

$35 \mu\text{L}$ の細胞培養培地を各ウェルから取り出し、 $35 \mu\text{L}$ の予熱した Cal 520

10

20

30

40

50

色素溶液と交換し、細胞プレートを 37°C / $5\% \text{CO}_2$ で 45 分間インキュベートした。細胞を 37°C で 5 分間インキュベートした。

【0343】

実験

自発電氣的活動を、Cal 520 (商標) (AAT Bioquest) カルシウム蛍光色素シグナル伝達を使用して記録する。この色素は、ウェル全体にわたる総細胞内カルシウム活性を統合する。Cal 520 色素のボトル ($50 \mu\text{g}$ 、MW: $1103 / \text{mol}$) を、 0.9mM のストック溶液として $50 \mu\text{l}$ の DMSO で溶解する。色素のストック溶液 $50 \mu\text{l}$ を 10mL の Trydies 溶液に添加して、色素濃度を $4.5 \mu\text{M}$ にした。続いて、この色素溶液 $35 \mu\text{l}$ を各ウェルに添加して、最終色素濃度を $1.58 \mu\text{M}$ にした。この CTCM ヒトアッセイに関する現在の色素プロトコルが最近確立された (Ivan Kopljar et al, Journal of Pharmacological and toxicological methods 2018. 91: 80-86; Lu et al., Tox Sci 2019. 170 (2): 345-356)。

10

【0344】

蛍光シグナル (Ca^{2+} 過渡現象の形態) を、機能的薬物スクリーニングシステム (FDSS / μCell 、浜松、日本) を使用して測定し、その後、その記録を適切なソフトウェア、例えば、Notocord を使用してオフラインで分析した。

20

【0345】

試験運転のために細胞プレートを FDSS / μCell にロードし、 Ca^{2+} 過渡現象を 4 分間測定して、各ウェルの心筋細胞の同期拍動を確認した。96 個全てのウェルを同時に測定した (サンプリング間隔: 0.06s 、短い曝露時間: 10ms 、励起波長 480nm 、発光波長 540nm 、FDSS / μCell を 37°C に加温)。全てが同期拍動を示した場合、96 ウェルプレートを 3 回繰り返し測定した (ベースラインでの 96 ウェル全ての同期拍動を検証するために、予め設定された基準を満たさなかったウェルを実験から除外し、化合物で処置しなかった)。

T = 0 : 対照期間 ($-5 \sim -1 \text{分}$) + 化合物添加、引き続いて 3 分間。

T = 30 : 化合物添加後 29 ~ 34 分で測定

30

【0346】

化合物添加工程中、各二重濃縮試験溶液 $100 \mu\text{l}$ を各ウェルに同時にピペットで注入した。

【0347】

データを、適切なソフトウェア、例えば Notocord-Hem (バージョン 4.3) を使用してオフラインで分析した。

【0348】

Ca^{2+} 過渡現象の形態の以下のパラメータを測定した。

【0349】

拍動数 (BR)

Ca^{2+} 過渡現象の振幅 (Amp)、

40

-CTD₉₀: 90% での Ca^{2+} 過渡現象の持続時間 (初期ベース値の 90% に至るまでの時間)。

【0350】

様々な「不整脈様」活動の存在も実験期間中に認められた。これらには以下が含まれる。

【0351】

「早期後脱分極様」(EAD 様) 事象 (「過渡現象の初期ピークに続く過渡現象波形の非常に小さいピーク」として定義される)、

「心室頻拍様」(VT 様) 事象 (非常に速い拍動数として定義される)、又は

「心室細動様」(VF 様) 事象 (「不規則性及び測定不能な過渡電位を有する小振幅高

50

速レート Ca^{2+} 波形」と定義される)

細胞の「拍動停止」(Ca^{2+} 過渡現象は観察されない)。

【0352】

カルシウム過渡現象シグナルの化合物誘導変化をソフトウェアによって分析できなかった場合、これらのシグナルをBQL (品質分析レベル未滿) として同定した。

【0353】

データ解析

FDS- μ Cell から測定されたデータをオフライン分析のためにコピーし、分析し、更なる分析のためにSPEC-EE (本発明者らの運用管理システム) にアップロードした。化合物の投与前後の変数の値を収集し、エクセルブックに移した。

10

【0354】

全ての値 (実際の単位及びベースライン値からの変化率) を中央値 (最小値及び最大値) として表す。化合物群で観察された (実際の単位での) 対応するベースライン値に対する変化を、ウィルコクソン-マン-ホイットニー検定を用いて溶媒対照群の変化と比較した。多重度調整のためのボンフェローニ補正を用いた両側検定を行った。溶媒群と比較してそれぞれ10の治療群が存在するので、 $0.05/10$ (0.005) のアルファレベルは、溶媒群との統計学的に有意な差を反映すると考えられた。全ての統計分析は、適切なソフトウェア、例えば、Rソフトウェアバージョン3.5.2を使用して行った。

【0355】

プレート中のhiPSC-CMの品質管理：

20

以下の基準を満たさない場合、プレートを不合格とした。

安定した規則的な拍動

500超の相対単位の振幅

25~80拍/分の間の拍動数

300~800msのCTD₉₀。

【0356】

本実験では、プレート中のhiPSC-CMが上記基準を満たした。

【0357】

不整脈の発生率又は拍動停止と組み合わせたこれらのパラメータを使用して、重み付けスコアリング法 (Kopljaret al., Stem Cell Reports 2018. 11, 1365-1377に基づく) を使用して潜在的危険レベルを計算した。このハザードスコアは、CTD₉₀、拍動数及び振幅 ($\Delta\Delta\%$) 並びに拍動停止及び早期後脱分極 (EAD) の発生の変化に対する許容差間隔 (TI) に基づいて重み付きポイントを加算することによって濃度毎に計算される。その結果、各濃度について、4つの異なる危険レベルのうちの1つが生成される。これは、化合物と30分間インキュベートした後に行う。危険レベルは以下のとおりである。

30

【0358】

危険なし：ビヒクル内の影響レベル又は小さな意味のない変化。

【0359】

低い危険性：意味のある影響であるが、心臓の負債のリスクはおそらく低い。

40

【0360】

高い危険性：心臓の負担に対する比較的高いリスク。

【0361】

非常に高い危険性：不整脈様事象 (EAD) による非常に高いリスク。

【0362】

「ハザードスコア」の結果は、(血漿タンパク質がウェルに添加されていないので) 遊離薬物当量での潜在的な急性心臓薬物誘発効果を同定するものである。ハザード同定の評価は、CTCM_Scoring_version1と呼ばれるスコアリング参照ブック (Kopljaret al., Stem Cell Reports 2018. 11: 1365-1377) を用いて実施し、表10の以下の表色系に従ってレベルを示す

50

。

【0363】

【表12】

表10－ハザード同定凡例の色スキーム

緑色	懸念なし
黄色	低い懸念
赤色	高い懸念
黒色	不整脈イベントによる非常に高い懸念

【0364】

関連する表で異なる色で上に列挙したH i P S c－C Mで測定したC a²⁺過渡現象アッセイに対するハザードスコア重症度による試験化合物のランク付け。

【0365】

結果

i C e l l（登録商標）心筋細胞2を細胞株として使用

陽性対照及び陰性対照：陽性対照及び陰性対照は全て

このアッセイにおいて予想された薬理学的効果を有していた。結果を以下の表11及び表12にまとめる。

【0366】

【表13】

表11－化合物A3のハザードスコア

化合物	色@0.1μM	色@0.2μM	色@0.5μM	色@1μM	色@2.5μM	色@5μM
A3	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色

【0367】

【表14】

表12－化合物A1のハザードスコア

化合物	色@0.1μM	色@0.3μM	色@1μM	色@3μM	色@10μM	色@30μM
A1	緑色	緑色	緑色	緑色	緑色	黄色

【0368】

化合物A1の場合：30mpk（mg／kg）のマウス異種移植モデルにおける有効用量で、CTCMヒト濃度対遊離C_{max}は以下のように推定されるであろう。

マージンCTCMヒト10μM対遊離C_{max}>16（マウス、ヒト）マージンCTCMヒト30μM対遊離C_{max}>45（マウス、ヒト）。

【0369】

8）hERGトランスフェクト細胞株における膜カリウム電流I_{Kr}に対する効果

【0370】

【表15】

プロトコル1：

略語

CHO	チャイニーズハムスター卵巣細胞株
DMSO	ジメチルスルホキシド
hERG	ヒトether-a-go-go関連遺伝子
I _{Kr}	遅延整流K ⁺ 電流の速い活性化

【0371】

方法

hERGカリウムチャネルを安定に発現するCHO細胞を用いて実験を行った。細胞を

、10%熱不活性化ウシ胎児血清、ハイグロマイシンB（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）及びジェネティシン（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を補充したハムF12培地中、培養フラスコ中で37℃及び5%CO₂で増殖させた。自動パッチクランプシステムで使用するために、QPatch（Sophion）細胞を回収して、単一細胞の細胞懸濁液を得た。

【0372】

溶液：浴溶液は、145mM NaCl、4mM KCl、10mMグルコース、10mM HEPES（（4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸）、2mM CaCl₂及び1mM MgCl₂（NaOHでpH7.4）を含有した。ピペット溶液は、120mM KCl、10mM EGTA（エチレングリコールビス（2-アミノエチルエーテル）-N,N,N',N'-四酢酸）、10mM HEPES、5.374mM CaCl₂及び1.75mM MgCl₂（KOHでpH7.2）を含有した。

【0373】

パッチクランプ実験を電位固定モードで行い、全細胞電流を、QPatchシステム（Sophion）を利用する自動パッチクランプアッセイで記録した。現在のシグナルを増幅し、デジタル化し、保存し、QPatchアッセイソフトウェアを用いて分析した。

【0374】

保持電位は-80mVであった。hERG電流（K⁺選択的外向き電流）を、+60mVへの2秒間の脱分極後の-40mVでの最大テール電流として測定した。パルスサイクリング速度は15秒であった。短いパルス（90ms）~-40mVが、テール電流振幅を計算するためのベースライン工程として機能した。ホールセル構成及び安定期間を確立した後、溶媒対照（0.3%DMSO）を5分間適用し、引き続いて試験物質を3×10⁻⁷M、3×10⁻⁶M、10⁻⁵M及び3×10⁻⁵Mの4つの漸増濃度で適用した。試験物質の各濃度を2回適用した。各濃度の結果は、5分後に3つの連続電圧パルスの平均電流として測定された。閉塞の程度を調べるために、残留電流をビヒクル前処理と比較した。

【0375】

個々のデータ点に対する非線形最小二乗フィッティングによって、濃度／応答関係を計算した。最大半量阻害濃度（IC₅₀）をフィッティングルーチンによって計算した。

【0376】

各化合物を少なくとも5ウェルで同じプレート上で複製した。阻害率の結果を以下の表13にまとめる。

【0377】

【表16】

表13-プロトコル1から得られたhERG IC₅₀（ μM ）

化合物番号	hERG-IC ₅₀ （ μM ）
A	>30.2

【0378】

9) 播種性OCI-AML3モデルにおける有効性実験

試験薬剤及び対照

化合物A3を20%ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン（HP- β -CD）に製剤化し、動物20gについて1用量当たり0.2mL（10mL/kg）の総体積に達するように調製した。用量は、毎日個々の体重によって調整した。化合物A3の作業用ストックを各実験用に週に1回調製し、25℃で保存した。

【0379】

動物

雌のSCIDベージュマウス（CB17.Cg-PrkdcscidLys^{tg}-J/Crl-）は、およそ6~8週齢で、体重がおよそ25gのときに使用した。全ての動物は、実験的使用の前に最低7日間、任意の出荷関連ストレスに順応し、それから回復

することができた。オートクレーブ処理した水及び照射食物を自由に与え、動物を12時間の明暗サイクルで維持した。ケージ、寝床、及び水筒を使用前にオートクレーブ処理し、毎週交換した。組織培養及び細胞注入試薬を以下の表14にまとめる。

【0380】
【表17】

表14－組織培養及び細胞注入試薬

DPBS(ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水)
熱不活化ウシ胎児血清
MEMアルファ培地
L-グルタミン
ゲンタマイシン
T175培養フラスコ
ローラボトル

10

【0381】
腫瘍モデル及び細胞培養方法

ヒトAML細胞株OCI-AML3を、示されている完全培養培地(MEMアルファ+20%HI-FBS(熱不活性化ウシ胎児血清)+2mML-グルタミン+50ug/mLゲンタマイシン)中、37℃、5%CO₂で培養した。対数増殖中に細胞を回収し、血清非含有培地中の冷(4℃)MEM((最小必須培地)アルファに再懸濁した。

20

【0382】
播種性OCI-AML3モデルについては、各マウスに26ゲージ針を使用して0.2mLの総体積でIV注射によって5×10⁵細胞を投与した。

【0383】
実験計画
化合物A3を経口(PO)で毎日投与した。

【0384】
0日目は、腫瘍細胞移植及び実験開始の日である。

【0385】
有効性試験では、IV OCI-AML3異種移植片腫瘍を有するマウスを、腫瘍細胞の生着の3日後に治療群に無作為に割り当てた。ビヒクル又は化合物A3による(30、50、100mg/kgでの)による治療を同じ日に開始し、28日間毎日投与した。

30

【0386】
動物のモニタリング
化合物毒性又は腫瘍負荷(すなわち、後肢麻痺、嗜眠など)のいずれかに関連する臨床徴候について動物を毎日モニタリングした。

【0387】
計算
生存評価のために、結果を腫瘍移植後の日数に対する生存率としてプロットした。陰性の臨床徴候及び/又は20%以上の体重減少を、死亡の代用エンドポイントとして使用した。カプラン・マイヤー生存分析を利用して生存期間中央値を求めた。生存期間の増加パーセント(ILS)を、((治療群の生存期間中央値-対照群の生存期間中央値)/対照群の生存期間中央値)×100として計算した。有害な臨床徴候(例えば、潰瘍化した腫瘍、体重減少など)のために代用エンドポイントに到達できなかった動物、又は治療とは無関係の死亡を、生存評価に関しては除外した。NCI基準によって定義されるように、25%以上のILSは生物学的に有意であるとみなされる。(Johnson J I et al. Br J Cancer. 2001. 84(10), 1424-1431)。

40

【0388】
データ解析

50

生存及び体重データを、Prism（バージョン7）を利用してグラフで表した。体重についての統計学的有意性を上記のように評価した。統計的有意性は、Rソフトウェアバージョン3.4.2のログランク（Mantel-Cox）検定を使用して、治療治療群対適切なビヒクル処置対照を比較する Kaplan-Meier 生存プロットについて評価した。p 値が ≤ 0.05 である場合、群間の差を有意とみなした。

【0389】

生存

Kaplan-Meier 生存曲線を図3に示す。確立されたOCI-AML3腫瘍を有するマウスに、20%HP-β-CD製剤中30、50、100mg/kgの化合物A3を毎日合計28日間経口投与した（n=9~10/群）。ビヒクル処置対照群の生存期間中央値38.5日に対して、化合物A3治療群では、30mg/kgで75.5日、50mg/kgで58.5日、及び100mg/kgで75日の生存期間中央値に達した。化合物A3の治療は、対照マウスの寿命と比較して、OCI-AML3腫瘍担持マウスの寿命を（30、50及び100mg/kg用量レベルで）96.1%、51.9%及び94.8%だけ統計学的に有意に増加させた（p ≤ 0.001）。これは、25%以上のILSのNCI基準閾値による生物学的に有意なILSであった（Johnson JI et al. Br J Cancer. 2001. 84（10），1424-1431）。

【0390】

安定性データ

(R)-N-エチル-5-フルオロ-N-イソプロピル-2-((5-(2-(6-(2-メトキシエチル)(メチル)アミノ)-2-メチルヘキサン-3-イル)-2,6-ジアザスピロ[3.4]オクタン-6-イル)-1,2,4-トリアジン-6-イル)オキシ)ベンズアミドビスベシル酸塩水和物の結晶形態Aについて安定性実験を行った。ビスベシル酸塩水和物は、化学的及び物理的に安定であり、評価されたストレス条件下では、UHPLCによって分解が観察されず、XRDによって固体状態の変化が観察されないことが見出される。

【0391】

【表18】

	ベシル酸塩の純度	XRD
参照	99.65	—
50℃/10% 室温、7日間	99.64	—
50℃/10% 室温、14日間	99.62	—
50℃/50% 室温、7日間	99.65	—
50℃/50% 室温、14日	99.66	—
参照	99.21	結晶、形態A、参照
50℃/30% 室温、21日間	99.32	参照に準拠
50℃/75% 室温、21日間	99.36	参照に準拠

10

20

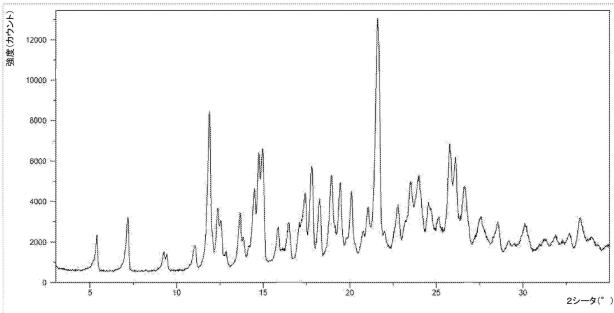
30

40

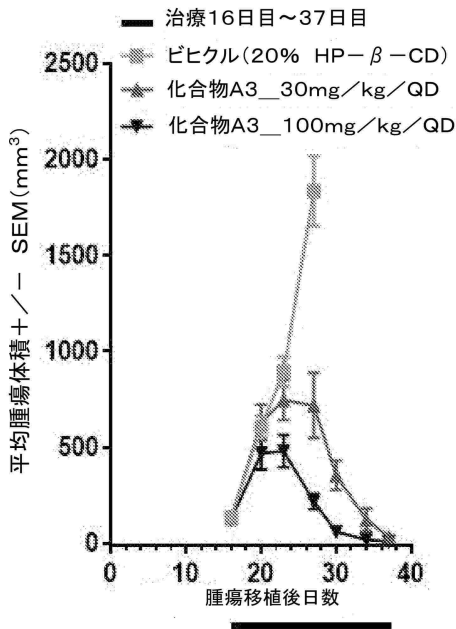
50

【図面】

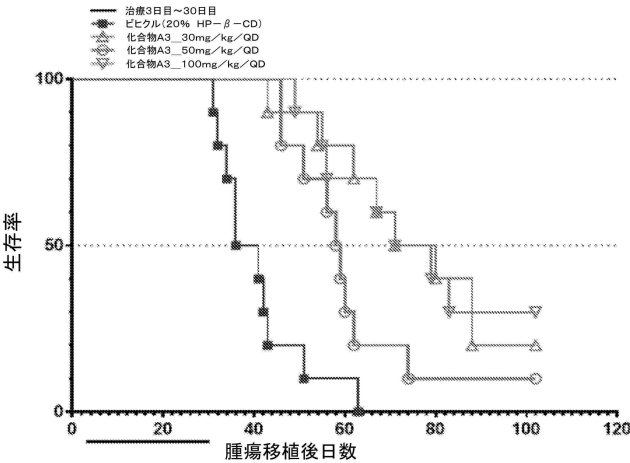
【図 1】



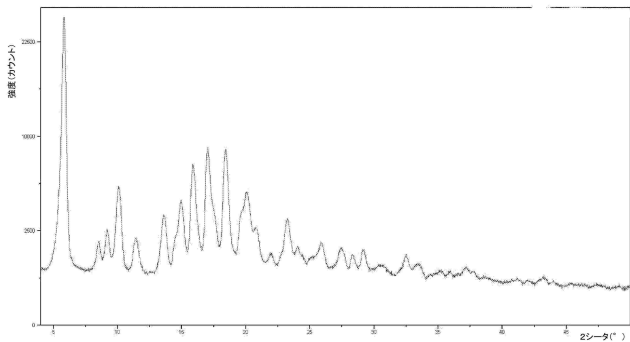
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

2024525145000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CN2022/099089

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. **C07D487/04 A61P35/00 A61K31/53 C07C1/00 C07D487/10**
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07D A61P A61K C07C

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2021/121327 A1 (JANSSEN PHARMACEUTICA NV [BE]; JOHNSON & JOHNSON CHINA INVEST LTD [CN]) 24 June 2021 (2021-06-24) examples examples such as compound 27, p.196; compound 70, p. 199 etc claims intermediates 27,28; page 73 - page 74 intermediate 234; page 121 ----- -/--	1-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

*** Special categories of cited documents :**

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 September 2022

Date of mailing of the international search report

20/09/2022

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Stix-Malaun, Elke

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/CN2022/099089

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 468 966 A1 (VITAE PHARMACEUTICALS INC [US]) 17 April 2019 (2019-04-17) cited in the application	19,20
A	examples scheme p. 23 page 56 pages 7,8 claims	1-18
A	EP 3 394 064 A1 (VITAE PHARMACEUTICALS INC [US]) 31 October 2018 (2018-10-31) cited in the application examples claims	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2022/099089
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/CN2022/099089

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2021121327 A1	24-06-2021	AU 2020404305 A1	04-08-2022
		CA 3161045 A1	24-06-2021
		CN 114867721 A	05-08-2022
		CO 2022009085 A2	08-07-2022
		IL 293965 A	01-08-2022
		KR 20220118500 A	25-08-2022
		TW 202138367 A	16-10-2021
		UY 38988 A	30-06-2021
		WO 2021121327 A1	24-06-2021
EP 3468966 A1	17-04-2019	AU 2017278950 A1	03-01-2019
		AU 2021258089 A1	25-11-2021
		BR 112018075260 A2	12-03-2019
		CA 3024180 A1	14-12-2017
		CN 109743875 A	10-05-2019
		DK 3468966 T3	09-11-2020
		EP 3468966 A1	17-04-2019
		EP 3805215 A1	14-04-2021
		ES 2831084 T3	07-06-2021
		HR P20201771 T1	19-02-2021
		HU E051451 T2	01-03-2021
		IL 263586 A	31-01-2019
		IL 283267 A	29-07-2021
		JP 7007302 B2	24-01-2022
		JP 2019517548 A	24-06-2019
		JP 2022058514 A	12-04-2022
		KR 20190017012 A	19-02-2019
		LT 3468966 T	25-02-2021
		PL 3468966 T3	06-04-2021
		PT 3468966 T	10-11-2020
		RU 2019100040 A	13-07-2020
		SI 3468966 T1	31-03-2021
		US 2019144459 A1	16-05-2019
		US 2021053974 A1	25-02-2021
		WO 2017214367 A1	14-12-2017
EP 3394064 A1	31-10-2018	AU 2016378579 A1	14-06-2018
		BR 112018012707 A2	29-01-2019
		CA 3005945 A1	29-06-2017
		CN 108779116 A	09-11-2018
		EP 3394064 A1	31-10-2018
		IL 259560 A	31-07-2018
		JP 2018538330 A	27-12-2018
		KR 20180103053 A	18-09-2018
		RU 2018126774 A	23-01-2020
		US 2019010167 A1	10-01-2019
		WO 2017112768 A1	29-06-2017

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 0 7 C 231/02 (2006.01)

F I

C 0 7 C 231/02

テーマコード (参考)

(54)【発明の名称】 キサン-3-イル)-2, 6-ジアザスピロ [3. 4] オクタン-6-イル)-1, 2, 4-トリアジン-6-イル) オキシ) ベンズアミドベシル酸塩
,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,D
K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD
,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,
LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,
RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,Z
A,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. PLURONIC

(72)発明者 カイ, ウェイ

中華人民共和国 シャンハイ 200233, シューフィ ディストリクト, グイ チン ロード 6
5, ナンバー 1 ビルディング, 2101, ジョンソン アンド ジョンソン (チャイナ) インベ
ストメント リミテッド

(72)発明者 ダイ, シュエドン

中華人民共和国 シャンハイ 200233, シューフィ ディストリクト, グイ チン ロード 6
5, ナンバー 1 ビルディング, 2101, ジョンソン アンド ジョンソン (チャイナ) インベ
ストメント リミテッド

(72)発明者 ケロル, オリヴィエ アレシス ジョルジュ

フランス国 セデックス 9 イシー-レームリノー 92787, ティーエスエー 91003, カ
ミーユ デムーラン リュー 1 ヤンセン-シラグ

(72)発明者 チューリング, ヨハネス ウィルヘルムス ジェイ.

ベルギー国 2340 ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ 30, ヤンセン ファーマシューティカ
エヌベー

(72)発明者 エヌジー, アリシア ティー フェイ

中華人民共和国 シャンハイ 200233, シューフィ ディストリクト, グイ チン ロード 6
5, ナンバー 1 ビルディング, 2101, ジョンソン アンド ジョンソン (チャイナ) インベ
ストメント リミテッド

(72)発明者 ダーヴィレ, ニコラス フレディー ジェイクス ブルーノ

ベルギー国 2340 ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ 30, ヤンセン ファーマシューティカ
エヌベー

(72)発明者 ゲールトマン, ロバート マイケル

ベルギー国 2340 ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ 30, ヤンセン ファーマシューティカ
エヌベー

(72)発明者 アフジャ, ディバリ

ベルギー国 2340 ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ 30, ヤンセン ファーマシューティカ
エヌベー

(72)発明者 リウ, インタオ

中華人民共和国 シャンハイ 200233, シューフィ ディストリクト, グイ チン ロード 6
5, ナンバー 1 ビルディング, 2101, ジョンソン アンド ジョンソン (チャイナ) インベ
ストメント リミテッド

(72)発明者 パンデ, ヴィニート

ベルギー国 2340 ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ 30, ヤンセン ファーマシューティカ
エヌベー

- (72)発明者 クリエーター, エドワード
イギリス国 エイチピー１２ ４イージー, ハイ ウィカム, ホルマーズ ファーム ウェイ ５０－
１００, ヤンセン－シラグ リミテッド
- (72)発明者 ベン ハイム, シリル
ベルギー国 ２３４０ ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ ３０, ヤンセン ファーマシューティカ
エヌベー
- (72)発明者 スモルダーズ, シモン ジャン シー
ベルギー国 ２３４０ ベルセ, トルンハウッサーヴェヒ ３０, ヤンセン ファーマシューティカ
エヌベー
- F ターム (参考) 4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 CB02 GA14 GA15 MA01 MA04 NA14
ZB26 ZB27
4H006 AA01 AA02 AB20 AC53 BJ50 BM30 BM71 BP30 BV72