



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I492749 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：100119614

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 06 月 03 日

(51)Int. Cl.：

*A61K31/505 (2006.01)**C07D239/42 (2006.01)**A61P3/06 (2006.01)**A61P9/10 (2006.01)**A61P9/12 (2006.01)*

(30)優先權：2010/06/04 日本

2010-128585

2010/09/29 日本

2010-218299

(71)申請人：興和股份有限公司(日本) KOWA COMPANY, LTD. (JP)

日本

(72)發明人：扇谷忠明 OHGIYA, TADAAKI (JP)；村上猛 MURAKAMI, TAKESHI (JP)；三代

澤勝利 MIYOSAWA, KATSUTOSHI (JP)；澀谷公幸 SHIBUYA, KIMIYUKI (JP)；

山崎浩市 YAMAZAKI, KOICHI (JP)；日下部太一 KUSAKABE, TAICHI (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

TW 2009/06804A

審查人員：陳瓚如

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：0 共 81 頁

(54)名稱

光學活性二苯甲胺衍生物及其製造方法

(57)摘要

本發明係關於降低 PCSK9 蛋白質質量，具有增加 LDL 受體量作用之實質上為純粹光學性(S)-trans-{4-[(2-[(1-[3,5-雙(三氟甲基)苯基]乙基){5-[2-(甲基磺醯基)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基]-4-(三氟甲基)苯基}(乙基)胺基)甲基]環己基}乙酸或其鹽，或彼等的溶劑合物。

公告本

發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100119614

A61K 31/505 (2006.01)

※申請日：100 年 06 月 03 日

※IPC 分類：

C07D239/42 (2006.01)

一、發明名稱：(中文／英文)

A61P 3/06 (2006.01)

光學活性二苯甲胺衍生物及其製造方法

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01)

二、中文發明摘要：

本發明係關於降低 PCSK9 蛋白質量，具有增加 LDL 受體量作用之實質上為純粹光學性 (S) -trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸或其鹽，或彼等的溶劑合物。

三、英文發明摘要：

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：無。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於作為醫藥的有效成分等為有用之光學活性二苯甲胺衍生物及其製造方法。

【先前技術】

近年來，隨著生活水準的提高，對於高熱量及高膽固醇型食物的變化，由肥胖、運動不足、高齡化等的脂質異常症（高脂血症）及這些所引起的動脈硬化性疾病的罹患者急速增加。低比重脂蛋白質（LDL）膽固醇值係與心疾病的發症率成正相關性已由佛明罕心臟試驗之研究為主的多數疫學研究亦得到證實，因此脂質異常症及動脈硬化症的藥物治療係以降低LDL膽固醇值為重點（非專利文獻1）。

高LDL膽固醇血症係為心血管疾病的強力危險因子之一，但該治療方法同時與HMG-CoA還原酵素阻礙藥（Statin）的登場而飛躍地進步。然而，Statin雖可強力地降低LDL膽固醇，但心血管疾病所引起的因心臟病意外發生、死亡率的降低率困住在約30%。雖可考慮到進一步降低LDL膽固醇，可進一步減低藉由心血管疾病所引起的死亡風險，但在Statin之高用量下的投與因會提高橫紋肌溶解症的風險故無法如期進行而成為問題。

因此與Statin為相異作用機制，且具有強力血中LDL膽固醇降低作用的醫藥受到期待。

前蛋白轉換酶（PCs）係為哺乳類的絲胺酸蛋白酶家族之成員，對於細菌之枯草桿菌蛋白酶或對於酵母之Kexin具有相同性。PCs之一的PCSK9（前蛋白轉換酶枯草桿菌蛋白酶/Kexin9型：Proprotein convertase subtilisin/kexin 9）主要表現在肝臟而於細胞外分泌，在肝細胞膜表面上與LDL受體結合，促進LDL受體的細胞內移動。移動至細胞內的LDL受體在細胞內器官被分解。LDL受體因具有將含有LDL膽固醇之脂蛋白自循環血液中輸送至肝臟的功能，故PCSK9蛋白質之產生會阻礙對肝臟之血中LDL膽固醇的吸收，作為結果，會提升血中LDL膽固醇。實際上，已知於PCSK9基因具有功能獲得型突變的人類血中LDL膽固醇的水準為高，此與體染色體顯性高膽固醇血症有關連（非專利文獻2）。另一方面，可維持於PCSK9基因具有功能喪失變異的人類血中LDL膽固醇水準為低（非專利文獻3）。又，在動物水準中，喪失肝臟的PCSK9基因的老鼠之LDL膽固醇顯示低值（非專利文獻4）。

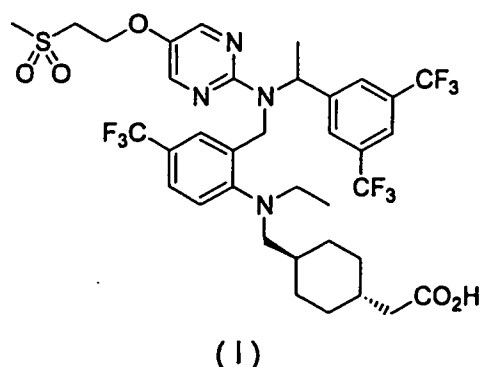
節由上述，藉由PCSK9蛋白質之產生抑制等減低該量或阻礙PCSK9蛋白質之功能，皆與LDL受體量的增加有關，更可考慮到與強力LDL膽固醇降低作用相關。

由如此背景來看，最近有關PCSK9蛋白質的功能阻礙或產生抑制之相關研究正積極地進行著。例如作為使用抗體或反義寡核苷酸者，已有藉由PCSK9的單株抗體之PCSK9蛋白質的功能阻礙或藉由RNA干涉的PCSK9蛋白質

之產生抑制等報告（非專利文獻5～7）。又，作為使用低分子化合物者，已有小蘗鹼使HepG2細胞中的PCSK9之mRNA與蛋白質水準降低的報告（非專利文獻8），或AnnexinA2活性化劑之5-阿紮胞苷促進PCSK9蛋白質與AnnexinA2之結合，抑制LDL受體的分解之報告（專利文獻1）。然而，對於低分子化合物的PCSK9蛋白質功能阻礙劑或PCSK9蛋白質產生抑制劑除前述以外並無其他報告。

且，專利文獻2中揭示對於膽固醇酯傳送蛋白質（CETP）顯示強阻礙活性，含有具有強血中HDL膽固醇增加作用的二苯胺結構之嘧啶化合物，作為該實施例45化合物有外消旋體（之下述式（I））：

[化1]



所示化合物（trans- { 4- { ({ 2- { ({ 1- { 3,5-雙（三氟甲基）苯基 } 乙基 } { 5- { 2-（甲基磺醯基）乙氧基 } 嘧啶-2-基 } 胺基 } 甲基 } -4-（三氟甲基）苯基 } （乙基）胺基 } 甲基 } 環己基 } 乙酸：以下在本說明書中，亦稱為「外消旋體化合物（racemic compound）（I）」）揭示，對於外消旋體化合物（I）與PCSK9蛋白質的關連性則完全

無記載亦無揭示。

於是，因PCs可影響到癌細胞之增殖、運動、黏著、侵襲，可作為癌治療的標的而受到注目（非專利文獻9）。其他已知PCs亦與肥胖、糖尿病、阿茲海默病的關連，或與後天性免疫不全症候群（AIDS）或重症急性呼吸器症候群（SARS）等病毒感染症等疾病亦有關連（非專利文獻10及11）。

因此，具有PCSK9蛋白質量之降低作用或功能阻礙作用的化合物，亦可期待作為對於上述疾病的醫藥有效成分而利用。

〔先行技術文獻〕

〔專利文獻〕

〔專利文獻1〕國際公開第2009/143633號說明書

〔專利文獻2〕國際公開第2008/129951號說明書

〔非專利文獻〕

〔非專利文獻1〕日本臨床，59卷增刊3，高脂血症（下），381-386（2001）

〔非專利文獻2〕Nat. Genet. 34, 154-156（2003）

〔非專利文獻3〕N. Engl. J. Med. 354, 1264-1272（2006）

〔非專利文獻4〕Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102, 5374-5379（2005）

〔非專利文獻5〕Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 106, 9820-9825（2009）

[非專利文獻 6] J. Lipid Res. 48, 763-767 (2007)

[非專利文獻 7] Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 105, 11915-11920 (2008)

[非專利文獻 8] Atherosclerosis, 201 (2) , 266-73 (2008)

[非專利文獻 9] Mol. Carcinogen., 44 (3) , 151-161 (2005)

[非專利文獻 10] J. Mol. Med., 83, 842-843 (2005)

[非專利文獻 11] J. Mol. Med., 83, 844-855 (2005)

【發明內容】

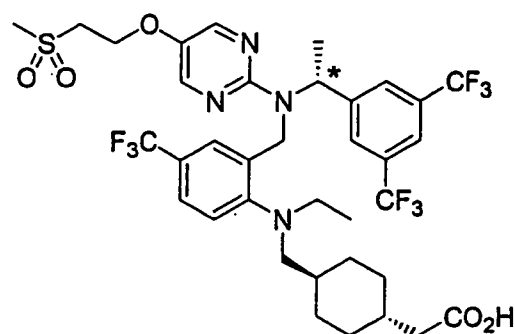
發明所要解決之課題

本發明的課題為提供一種具有降低 PCSK9 蛋白質量，增加 LDL 受體量的作用之低分子化合物、及將該低分子化合物作為有效成分之醫藥。

解決課題之手段

本發明者們欲解決上述課題繼續進行詳細研究結果，發現外消旋體化合物（I）、及其鏡像異構物之一的下述式（II）：

[化2]

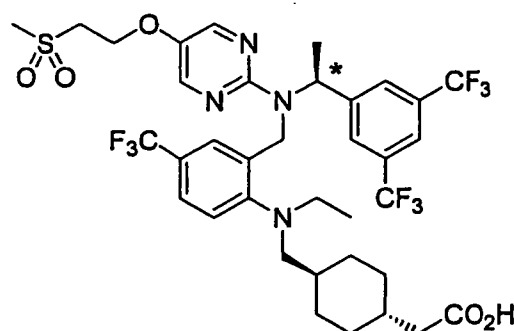


(II)

所示 (R) -trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 基 } { 5- [2- (甲 基 磺 醯 基) 乙 氧 基] 嘧 啶 - 2-基 } 胺 基) 甲 基] -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲 基] 環 己 基 } 乙 酸 (以 下 在 本 說 明 書 中 亦 稱 為 「 (R) 體 化 合 物 (II) 」) 中 , 雖 見 不 到 PCSK9 蛋 白 質 量 的 降 低 作 用 、 LDL 受 體 量 之 增 加 作 用 , 但

下 述 式 (III) :

[化3]



(III)

所 示 左 旋 性 的 (S) -trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 基 } { 5- [2- (甲 基 磺 醯 基) 乙 氧 基] 嘧 啶 -2-基 } 胺 基) 甲 基] -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲 基] 環 己 基 } 乙 酸 (以 下 在 本 說 明 書 中 亦

稱為「(S)體化合物(III)」)，或其鹽，或彼等的溶劑合物可強力地降低PCSK9蛋白質量，具有增加LDL受體量之作用，而完成本發明。

即，本發明係為提供(S)-trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙(三氟甲基)苯基]乙基} { 5- [2- (甲基磺醯基)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基] -4- (三氟甲基)苯基} (乙基)胺基)甲基]環己基}乙酸，或其鹽，或彼等的溶劑合物(較佳為實質上為純粹光學性(S)-trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙(三氟甲基)苯基]乙基} { 5- [2- (甲基磺醯基)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基] -4- (三氟甲基)苯基} (乙基)胺基)甲基]環己基}乙酸，或其鹽，或彼等的溶劑合物)。

又，由另一觀點來看，本發明亦提供trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙(三氟甲基)苯基]乙基} { 5- [2- (甲基磺醯基)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基] -4- (三氟甲基)苯基} (乙基)胺基)甲基]環己基}乙酸的左旋性鏡像異構物，或其鹽，或彼等的溶劑合物(較佳為實質上為純粹光學性trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙(三氟甲基)苯基]乙基} { 5- [2- (甲基磺醯基)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基] -4- (三氟甲基)苯基} (乙基)胺基)甲基]環己基}乙酸的左旋性鏡像異構物，或其鹽，或彼等的溶劑合物)者。

又，本發明提供將(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分之醫藥。

又，本發明含有作為有效成分之（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等的溶劑合物、及製藥上可被許可的載體之醫藥組成物。

該醫藥及醫藥組成物可藉由降低血中LDL膽固醇，可作為因高血中LDL膽固醇狀態所引起的疾病（例如高LDL血症、脂質異常症（高脂血症）、動脈硬化症、粥狀性動脈硬化症、末梢血管疾病、高膽固醇血症、家族性高膽固醇血症、心臟血管障礙、狹心症、缺血症、心肌缺血症、血栓症、心肌梗塞、再灌注障礙、血管形成性再狹窄、高血壓等）的預防及/或治療時的醫藥使用。

且本發明為提供使用於製造高血中LDL膽固醇狀態所引起的疾病之預防及/或治療的醫藥之（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等的溶劑合物的使用；使用於高血中LDL膽固醇狀態所引起的疾病之預防及/或治療的（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等溶劑合物。

又，本發明為提供將（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分之PCSK9 mRNA表現抑制劑；將（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分的PCSK9蛋白質量之降低劑；將（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分之PCSK9蛋白質產生抑制劑；及將（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分之LDL受體量的增加劑。

進一步本發明為提供使用於製造PCSK9 mRNA表現抑

制劑、PCSK9蛋白質量的降低劑、PCSK9蛋白質產生抑制劑或LDL受體量的增加劑時的(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物的使用；及作為PCSK9 mRNA表現抑制劑、PCSK9蛋白質量的降低劑、PCSK9蛋白質產生抑制劑或LDL受體量之增加劑的有效成分使用的(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物。

又，本發明為提供將(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分之使用於與PCs相關的疾病(癌、肥胖、糖尿病、阿茲海默病，或病毒感染症等)之預防及/或治療的醫藥。

進一步本發明為提供欲製造與PCs相關的疾病之預防及/或治療的醫藥時的(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物之使用；及欲使用於與PCs相關的疾病之預防及/或治療時的(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物。

進一步由另一觀點來看，本發明為提供以外消旋體化合物(I)、專利文獻2 實施例44所記載之化合物(trans-{4-[(2-[(1-(3,5-雙(三氟甲基)苯基)乙基){5-[2-(甲基硫代)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基]-4-(三氟甲基)苯基}(乙基)胺基)甲基]環己基}乙酸)，或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分之HMG-CoA還原酵素mRNA表現抑制劑；以外消旋體化合物(I)、專利文獻2 實施例44所記載之化合物，或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等

的溶劑合物作為有效成分之HMG-CoA還原酵素產生抑制劑；及以外消旋體化合物（I）、專利文獻2 實施例44所記載之化合物，或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分之HMG-CoA還原酵素mRNA表現所引起的疾病（例如發炎、癌、阿茲海默病、骨質粗鬆症、前立腺肥大、絲球體疾病、寄生蟲感染、病毒感染、乾癬、黃斑變性等）之預防及/或治療時的醫藥。

又，本發明為提供欲製造HMG-CoA還原酵素mRNA表現抑制劑、HMG-CoA還原酵素產生抑制劑，或HMG-CoA還原酵素mRNA表現所引起的疾病之預防及/或治療的醫藥之外消旋體化合物（I）、專利文獻2 實施例44所記載之化合物，或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物的使用；及作為HMG-CoA還原酵素mRNA表現抑制劑、HMG-CoA還原酵素產生抑制劑，或HMG-CoA還原酵素mRNA表現所引起的疾病之預防及/或治療上的醫藥之有效成分使用之外消旋體化合物（I）、專利文獻2 實施例44所記載之化合物，或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物。

又，本發明為提供抑制含有人類之哺乳類動物的活體內之PCSK9 mRNA的表現之方法，其為含有將（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等的溶劑合物之有效量，投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法；降低含有人類之哺乳類動物的活體內之PCSK9蛋白質量的方法，其為含有將（S）體化合物（III），或其鹽，或彼等的溶劑合物的

有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法；抑制含有人類之哺乳類動物的活體內之 PCSK9 蛋白質的產生之方法，其為含有將 (S) 體化合物 (III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物的有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法；增加含有人類之哺乳類動物的活體內之 LDL 受體量的方法，其為含有將 (S) 體化合物 (III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物的有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法；及降低含有人類之哺乳類動物的血中 LDL 之方法，其為含有將 (S) 體化合物 (III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物的有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法。

又，本發明為提供含有人類之哺乳類動物中之高血中 LDL 膽固醇狀態所引起的疾病之預防及/或治療方法，其為含有將 (S) 體化合物 (III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物的有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法。

且，本發明為提供含有人類之哺乳類動物的與 PCs 相關的疾病之預防及/或治療方法，其為含有將 (S) 體化合物 (III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物的有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法。

且，本發明為提供抑制含有人類之哺乳類動物的活體內之 HMG-CoA 還原酵素 mRNA 的表現之方法，其為含有將外消旋體化合物 (I)、專利文獻 2 實施例 44 所記載之化合物，或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物的有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法。

；抑制含有人類之哺乳類動物的活體內之 HMG-CoA 還原酵素的產生之方法，其為含有將外消旋體化合物（I）、專利文獻 2 實施例 44 所記載之化合物，或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物的有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法；及預防及 / 或治療含有人類之哺乳類動物中之 HMG-CoA 還原酵素 mRNA 表現所引起的疾病之方法，其為含有將外消旋體化合物（I）、專利文獻 2 實施例 44 所記載之化合物，或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物的有效量投與於含有人類之哺乳類動物的步驟之方法。

又，本發明亦提供將（S）體化合物（III）及 / 或（R）體化合物（II）作為實質上純粹光學性形態而製造之方法。

專利文獻 2 中雖記載外消旋體化合物（I）之製造方法，對於將（S）體化合物（III）或（R）體化合物（II）作為實質上純粹光學性形態而製造時，有著如以下之極困難的狀況。

即，作為一般論，已知實質上純粹光學性化合物，有時可於合成該外消旋體後藉由鏡像異構物層析管柱（chiral column）進行光學分割而製造。

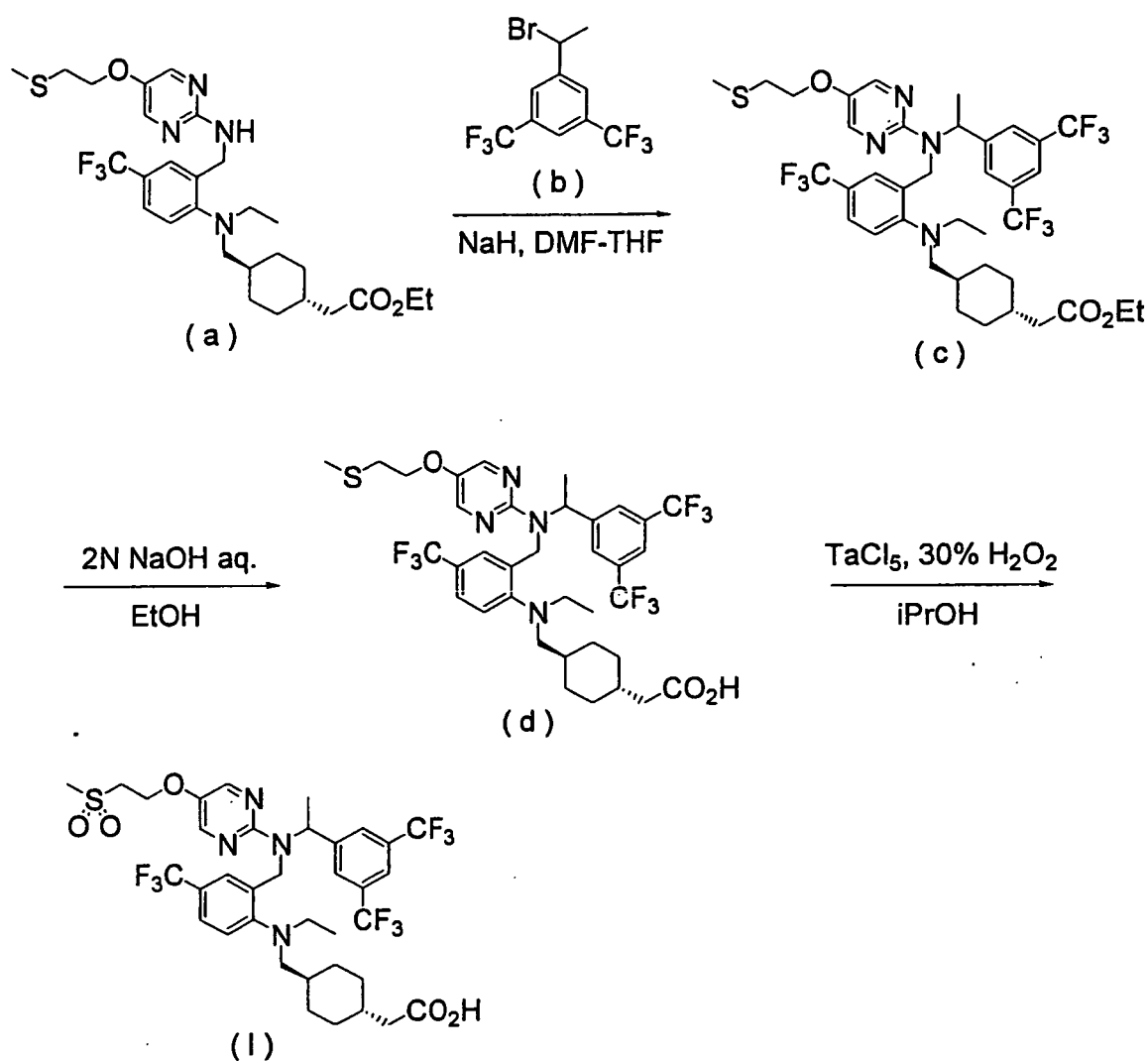
然而，使用鏡像異構物層析管柱之光學分割法，依據化合物之分割條件的設定非常困難，又工業上無法大規模地製造。另外，使用鏡像異構物層析管柱之光學分割法，在實質上純粹光學性（S）體化合物（III）或（R）體化

合物（II）之製造上，該分割條件之設定非常困難。即，鏡像異構物層析管柱的種類（例如 CHIRALCEL OD-H、CHIRALCEL OJ-H等），作為移動相所使用的溶劑之種類組成（例如、MeOH/TFA混液、EtOH/TFA混液等）、移動相的流速等條件做種種變更，嘗試進行由依據專利文獻2實施例45所記載之方法所製造之外消旋體化合物（I）的各鏡像異構物之分取，但幾乎所有條件下皆無法順利地分離。如此中得知若在後述實施例1-1所記載之條件下可進行各鏡像異構物之分離，且在該條件下可產生分解物（乙基酯體）。

又，專利文獻2中揭示對於外消旋體化合物（I），依據下述流程1所示方法，將中間體化合物（a）與外消旋體之溴甲苯體（b）在鹼存在下使其耦合，將所得之化合物（c）的酯基經水解後作為化合物（d），最後氧化硫原子之方法可製造。

流程 1

[化4]



參考流程 1，本發明者們取代外消旋體之溴甲苯體（b），使用光學活性 1-〔3,5-雙（三氟甲基）苯基〕-1-甲磺醯氧基乙烷，嘗試得到實質上純粹光學性（S）體化合物（III）或（R）體化合物（II），但 1-〔3,5-雙（三氟甲基）之苯基〕-1-甲磺醯氧基乙烷會優先進行脫離反應，無法得到目的化合物。

又，取代甲磺醯基，使用具有甲苯磺醯基、氯甲磺醯基或 2,4,6-三異丙基苯磺醯基等脫離基之光學活性苯甲基

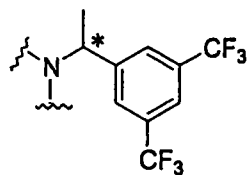
化進行檢討，但與1-〔3,5-雙（三氟甲基）苯基〕-1-甲磺醯氧基乙烷的情況同樣地，無法得到實質上純粹光學性（S）體化合物（III）或（R）體化合物（II）。

又，至今使用苯甲溴體（b）時，因達成對中間體化合物（a）之氮原子的〔3,5-雙（三氟甲基）苯基〕-1-乙基的導入，而考慮取代外消旋體的溴甲苯體（b）而使用光學活性溴甲苯體，而得到實質上純粹光學性（S）體化合物（III）或（R）體化合物（II）。

然而，已知在一般溴化物離子脫離的求核取代反應中，藉由反應所產生的溴化物離子在反應系中會與溴甲苯進行反應，而進行外消旋化。又，已知在一般苯甲基位之求核取代反應中，藉由苯甲基陽離子之安定化，SN1型的取代反應亦會進行競合，故會引起部分外消旋化。

其中，藉由部分外消旋化會得到降低光學純度之結果，具有中程度之光學純度的化合物（本說明書中所謂「具有中程度之光學純度的化合物」為表示10%ee程度以上而未達90%ee，較佳20～80%ee程度，特佳為40～70%ee程度的光學純度，具有中程度之光學純度的化合物在以下亦稱為「對掌體（Sumichiral）」）。且對於該對掌體，下述部分結構中，以*符號所示不對稱碳原子為S配置的化合物，若比R配置的化合物更過剩量存在時，特別稱為「（S）體優位之對掌體」。另一方面，該對掌體中，以*符號所示不對稱碳原子為R配置的化合物若比S配置的化合物更過剩量存在時，則特別稱為「（R）體優位之對掌體」）對於

[化5]



，已知藉由僅將單方鏡像異構物進行優先晶析時，可提高光學純度。

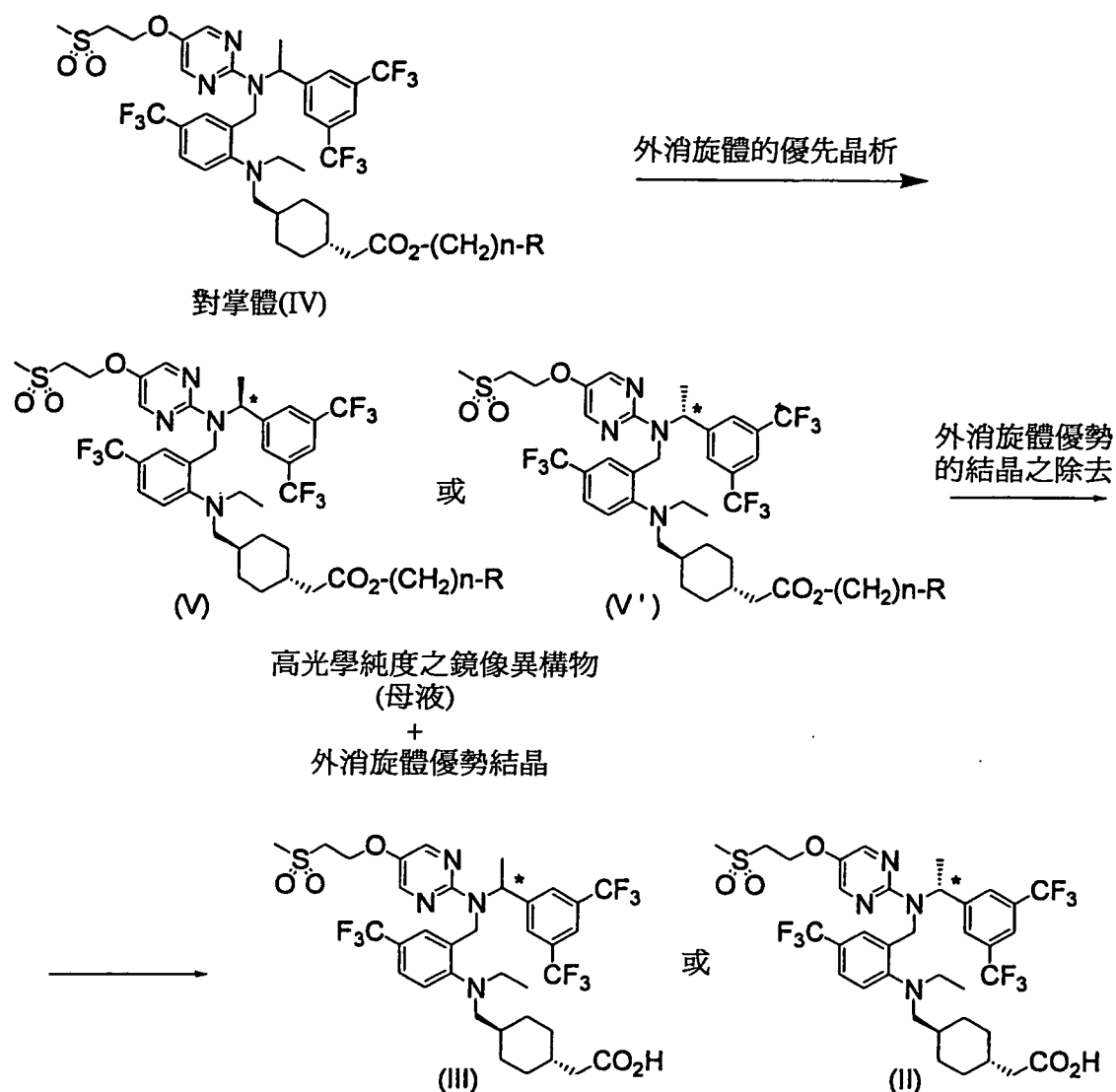
然而，藉由本發明者們的檢討，外消旋體化合物（I）及該乙基酯衍生物並無進行結晶化，藉由優先晶析法無法提高光學純度。

該狀況下，本發明者們將外消旋體化合物（I）的羧酸變更為苯甲基酯時，發現所得之苯甲基酯化合物可分離為以外消旋體作為主成分的結晶。

而如下述流程2所示，製造芳基烷基或雜芳基烷基酯化合物的對掌體（IV），外消旋體作為成分晶析出優勢低光學純度的結晶（以下在本說明書中有時稱為「外消旋體優勢結晶」。）後除去後，得到高光學純度之芳基烷基或雜芳基烷基酯體（V）或（V'），藉由將此作為原料，可將外消旋體化合物（I）的所望鏡像異構物（（S）體化合物（III）及（R）體化合物（II））作為實質上純粹光學性形態而成功地製造。

流程 2

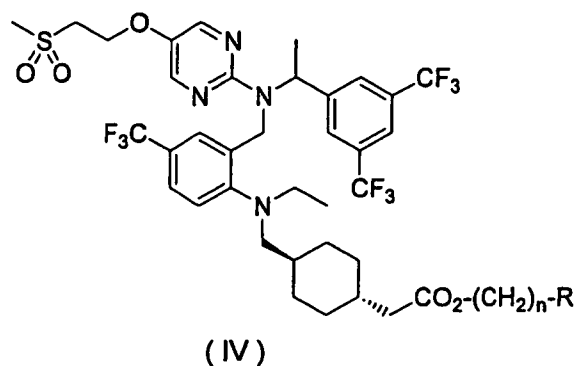
[化6]



(流程圖中，R表示可具有取代基之 C_{6-10} 芳基或可具有取代基之 5-10 員雜芳基，n表示 1~6 的整數)

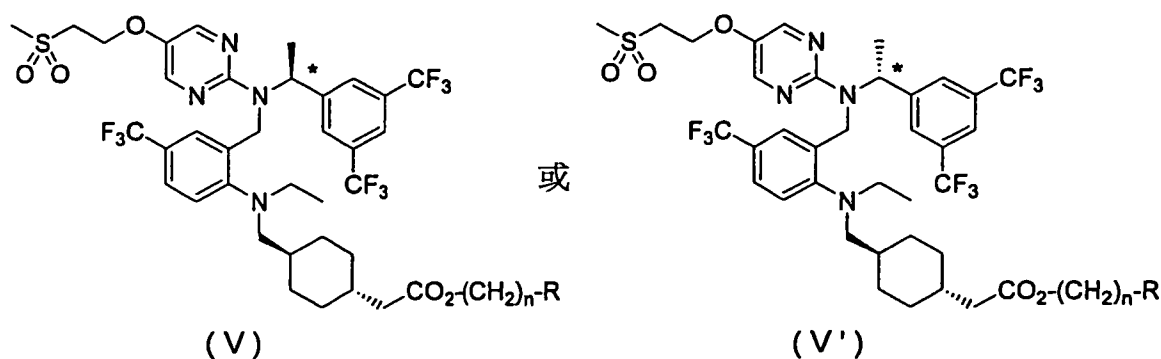
即，本發明為提供實質上純粹光學性 (S) 體化合物 (III) 或實質上純粹光學性 (R) 體化合物 (II)，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物之製造方法，其為含有由下述一般式 (IV)：

[化7]



(式中，R表示可具有取代基之 C_{6-10} 芳基或可具有取代基之5-10員雜芳基，n表示1~6的整數)所示化合物的對掌體，在溶劑中使外消旋體優勢結晶優先晶析 (preferential crystallization) 而除去後，得到下述一般式 (V) 或 (V') :

[化8]



(式中，R及n與一般式 (IV) 中者同義) 所示實質上純粹光學性化合物的步驟之方法。

上述方法中，在一般式 (IV) 所示化合物為 (S) 體優勢對掌體時，可製造出 (S) 體化合物 (III)，在一般式 (IV) 所示化合物為 (R) 體優勢對掌體時，可製造出 (R) 體化合物 (II)。

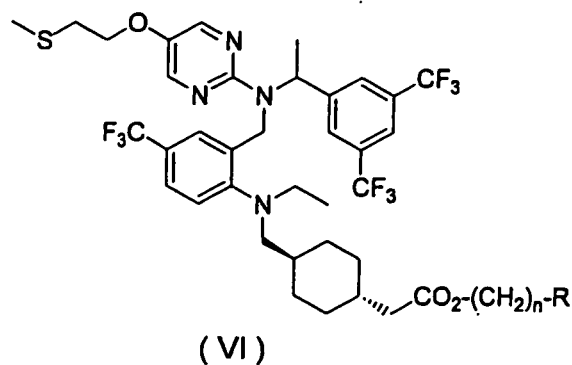
又，本發明為提供進一步含有由一般式 (V) 或 (V')

所示化合物除去以 $-(CH_2)_n-R$ 所示基的步驟之上述方法。

且本發明為提供

進一步含有將 (A) 下述一般式 (VI) :

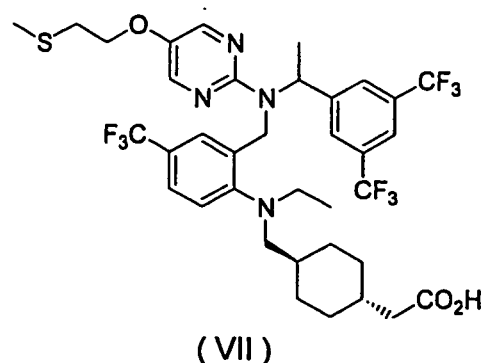
[化9]



(式中，R及n與一般式(IV)中者同義)所示化合物的對掌體在溶劑中，與氧化劑進行反應，製造一般式(IV)所示化合物的對掌體之步驟的上述方法；

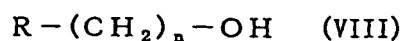
進一步含有將 (B) 下述式 (VII) :

[化10]



所示對掌體與下述一般式 (VIII) :

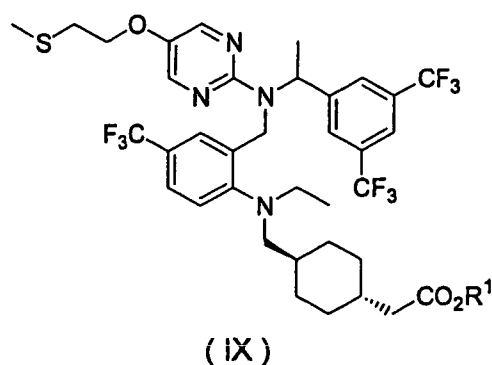
[化11]



(式中，R及n與一般式(IV)中者同義)所示化合物在溶劑中，於觸媒存在下進行反應，得到一般式(VI)所示化合物的對掌體之步驟的上述方法(A)；

進一步含有將(C)下述一般式(IX)：

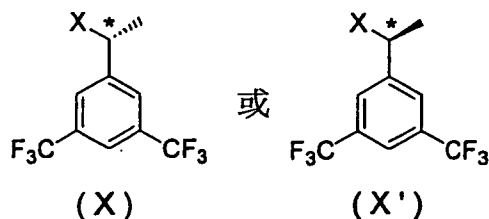
[化12]



(式中，R¹表示C₁₋₆烷基)所示化合物的對掌體在溶劑中於鹼存在下進行水解，製造式(VII)所示化合物的對掌體之步驟的上述方法(B)；

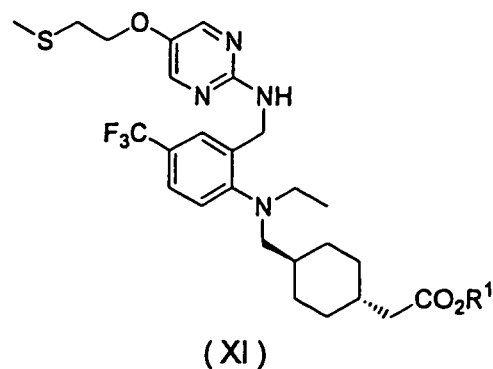
進一步含有將(D)下述一般式(X)或(X')：

[化13]



(式中，X表示鹵素原子)所示化合物與下述一般式(XI)：

[化14]



(式中， R^1 與一般式(IX)中者為同義)所示化合物在溶劑中，於鹼存在下進行反應，製造一般式(IX)所示化合物的對掌體之步驟的上述方法(C)。

又，本發明為提供含有將光學活性 1-〔3,5-雙（三氟甲基）苯基〕乙醇在鹵化劑的存在下進行鹵化後製造一般式（X）或（X'）所示化合物的步驟之上述方法（D）。

由另一觀點來看，本發明為提供上述一般式（IV）所示化合物，或其鹽，或彼等溶劑合物。該發明的較佳型態係R為苯基，n為1之化合物，或其鹽，或彼等的溶劑合物。

又，本發明為提供上述一般式（V）或（V'）所示實質上純粹光學性化合物，或其鹽，或彼等的溶劑合物者。該發明之較佳型態係R為苯基，n為1之化合物，或其鹽，或彼等的溶劑合物。

〔發明的效果〕

(S) 體化合物 (III) 具有優良 PCSK9 蛋白質量的降低作用、LDL 受體量的增加作用，且顯示優良的血中 LDL

膽固醇降低作用，故例如可作為降低血中LDL膽固醇的醫藥之有效成分等使用。

又，（S）體化合物（III）對於與PCs之相關疾病，更具體為作為對於癌、肥胖、糖尿病、阿茲海默病，或病毒感染症之預防及/或治療的醫藥之有效成分亦有用。

且所謂本發明之製造方法，可將外消旋體化合物（I）的所望鏡像異構物（（S）體化合物（III）及（R）體化合物（II））作為實質上純粹光學性形態而簡便地製造，例如適用於製造作為醫藥有效成分等有用的實質上純粹光學性（S）體化合物（III）的方法上。

實施發明的形態

本說明書中，所謂「實質上純粹光學性」表示化合物之光學純度為90%ee以上，較佳為95～100%ee，特佳為97～100%ee。

因此，例如所謂「實質上純粹光學性（S）-trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸」，「實質上純粹光學性trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸的左旋性鏡像異構物」及「實質上純粹光學性（S）體化合物（III）」

表示光學純度 90%ee 以上，較佳為 95～100%ee，特佳為 97～100%ee 之 (S) 體化合物 (III)。

本發明中，作為 (S) 體化合物 (III) 的光學純度，由得到良好 PCSK9 蛋白質量之降低作用及 / 或 LDL 受體量的增加作用之觀點來看，下述實施例 1-1 所示手性 HPLC 分析條件中，以 98%ee 以上為佳，以 99%ee 以上為特佳。若為該光學純度，表示實質上未含有其他鏡像異構物 ((R) 體化合物 (II))。

本說明書中，所謂「C₁₋₆烷基」表示直鏈狀或支鏈狀之碳數 1～6 的烷基，例如可舉出甲基、乙基、n-丙基、異丙基、n-丁基、異丁基、sec-丁基、tert-丁基、n-戊基、異戊基、新戊基、n-己基、異己基等。

本說明書中所謂「可具有取代基之 C₆₋₁₀芳基」的「C₆₋₁₀芳基」部分表示碳數 6～10 的芳香族烴基，例如可舉出苯基、萘基、蒽基等。

本說明書中，所謂「可具有取代基之 5-10 員雜芳基」的「5-10 員雜芳基」部分表示將選自氧原子、硫原子、及氮原子的雜原子作為環構成原子，含有 1 至 4 個的 5～10 員之單環式、多環式，或縮合環式的芳香族雜環基，例如可舉出呋喃基、噻吩基、吡咯基、噁唑基、異噁唑基、噻唑基、異噻唑基、咪唑基、吡唑基、噁二唑基、噻二唑基、三唑基、四唑基、吡啶基、嘧啶基、吡嗪基、噻嗪基、苯並呋喃基、異苯並呋喃基、苯並噻吩基、吲哚基、異吲哚基、吲唑基、苯並咪唑基、苯並噁唑基、苯並異噁唑基、

苯並噻唑基、苯並異噻唑基、苯並噁二唑基、苯並噻二唑基、苯並三唑基、喹啉基、異喹啉基、喹噁啉、喹啉基、喹喔啉基、酞嗪基、蔡啶基、嘌呤基、喋啶基、呋喃並吡啶基、噻吩並吡啶基、吡咯並吡啶基、噁唑並吡啶基、噻唑並吡啶基、咪唑並吡啶基等。

本說明書中作為「可具有取代基之 C_{6-10} 芳基」、「可具有取代基之 5-10 員雜芳基」的取代基，例如可舉出鹵素原子、羧基、胺基甲醯基、磺醯基、胺磺醯基、硝基等。又，取代基的數目為 1~可取代之最大數，一般為可具有 1~5 個取代基。作為鹵素原子可使用氟原子、氯原子、溴原子，或碘原子中任一。

一般式中，作為 R 中可具有取代基之 C_{6-10} 芳基，以苯基為佳。

又，一般式中，作為 n 所示整數，以 1 為佳。

又，一般式中，作為 R^1 中的 C_{1-6} 烷基，以 C_{1-4} 烷基為佳，以乙基為較佳。

又，一般式中，作為 X 所示鹵素原子，以氯原子或溴原子為佳，以溴原子為較佳。

本發明中，作為各化合物（例如（S）體化合物（III）、一般式（IV）所示化合物、一般式（V）所示化合物、一般式（V'）所示化合物等）的鹽，例如可舉出酸加成鹽或鹼加成鹽等，若為作為醫藥可被許可得鹽即可並無特別限定。具體為例如若為酸加成鹽可舉出與如鹽酸鹽、溴化氫酸鹽、碘化氫酸鹽、硫酸鹽、硝酸鹽、磷酸鹽之無機

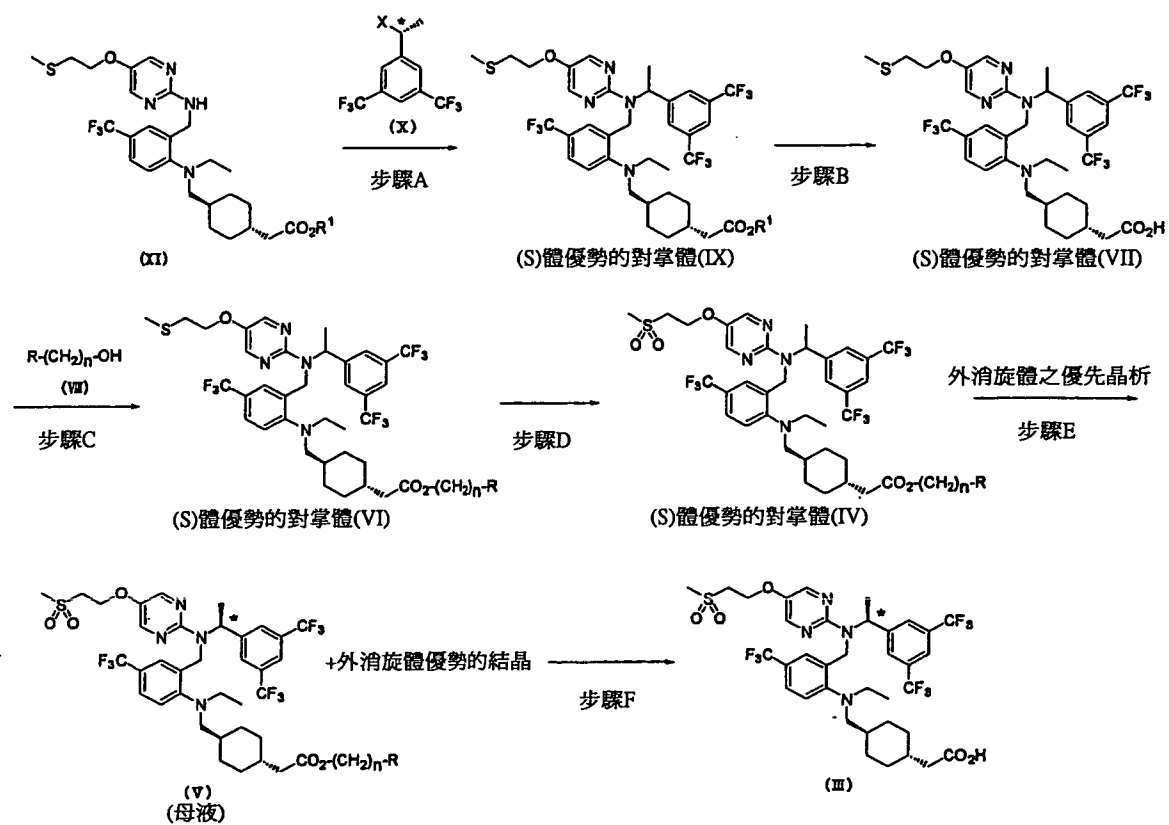
酸之酸加成鹽；與安息香酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、p-甲苯磺酸鹽、馬來酸鹽、富馬酸鹽、酒石酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽等有機酸的酸加成鹽。又，若為鹼加成鹽可舉出與鈉鹽、鉀鹽、鋰鹽、鈣鹽、鎂鹽等金屬之鹼加成鹽；與氨、三甲胺、三乙胺、吡啶、可立丁（Collidine）、盧剔啉（Lutidine）等胺鹽；賴胺酸、精胺酸等有機鹼的鹼加成鹽等。

本發明中，作為形成各化合物（例如（S）體化合物（III）、一般式（IV）所示化合物、一般式（V）所示化合物、一般式（V'）所示化合物等）或其鹽的溶劑化合物之溶劑，除水以外，可舉出生理學上可被許可的有機溶劑，例如可舉出乙醇、己烷、乙酸乙酯等，但並未限定於此等。作為本發明的醫藥之有效成分，例如可舉出水和物等，但並未限定於此等。

將本發明的實質上純粹光學性（S）體化合物（III）之製造方法的一例子記載於下述流程3中，將實質上純粹光學性（R）體化合物（II）之製造方法的一例子記載於下述流程4中（下述流程圖中，R、R¹、X及n與前述同義）。

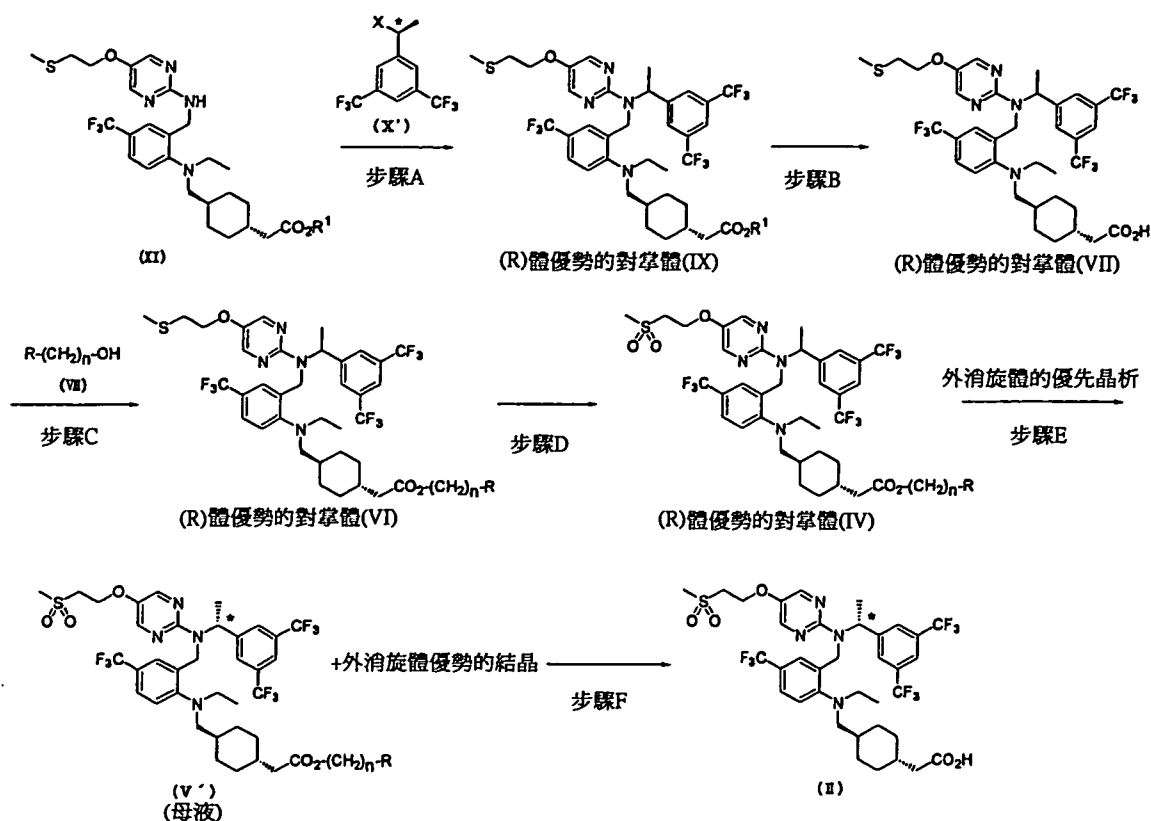
流程 3

[化15]



流程 4

[化16]



<步驟 A>

本步驟為將胺 (XI) 在鹼存在下，與光學活性苯甲基鹵化物 (X) 或 (X') 進行反應，製造對掌體 (IX) 的步驟。化合物 (X) 或 (X') 的量對於化合物 (XI) 為 1.0 ~ 3.0 莫耳當量，較佳為 1.5 ~ 2.5 莫耳當量即可。

且胺 (XI) 為公知化合物，其製造方法例如記載於專利文獻 2。

本反應可在溶劑中，鹼之存在下進行。作為溶劑，雖無特別限定，例如可將 N,N-二甲基甲醯胺、N-甲基吡咯烷酮、二甲基亞砜、二噁烷、四氫呋喃、乙腈、丙腈等單獨或組合使用。作為溶劑，較佳可舉出四氫呋喃、N,N-二甲

基甲醯胺及其混合溶劑。溶劑的量雖無特別限定，但對於化合物（XI）而言以2~20倍量（V/W）為佳，較佳為5~12倍量（V/W，更佳為7~10倍量（V/W）。

作為鹼，雖無特別限定，例如可使用氫化鋰、氫化鈉、氫化鉀等氫化鹼金屬類；金屬鋰、金屬鈉、金屬鉀等鹼金屬類；氫氧化鋰、氫氧化鈉、氫氧化鉀等氫氧化鹼金屬類；碳酸鋰、碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸鉍等碳酸鹼金屬類；鋰二異丙基醯胺、鈉二異丙基醯胺、鉀二異丙基醯胺、六甲基二矽胺化鋰、六甲基二矽胺化鈉、六甲基二矽胺化鉀等鹼金屬醯胺類；t-丁氧基鈉、t-丁氧基鉀等烷氧基鹼金屬類；n-丁基鋰、s-丁基鋰、t-丁基鋰等有機鋰類。作為鹼，較佳可舉出氫化鹼金屬類，更佳可舉出氫化鈉。鹼的量對於化合物（XI）而言為1.0~5.0莫耳當量，較佳為2.0~4.0莫耳當量。

反應一般在溫度為-80~100℃之範圍下進行，較佳為-30~50℃，更佳為-20~5℃。反應時間一般為5分鐘~48小時，較佳為30分鐘~24小時，更佳為3~8小時。本反應中，使用實質上純粹光學性苯甲基鹵化物（X）或（X'）為佳。藉由該反應進行部分外消旋化，得到對掌體（IX）。可將該對掌體（IX）直接使用於次步驟。於步驟B~D中，光學純度可實質上被維持，可得到具有與對掌體（IX）同程度之光學純度的對掌體（IV）。且，經由本發明者們的研究，即使本步驟中使用R¹為苯甲基之胺（XI），進行與光學活性苯甲基鹵化物（X）或（X'）的反應，亦無法

高產率下得到目的物之對掌體（IX），使用R¹為C₁₋₆烷基時可高產率下得到所望對掌體（IX）。

<步驟B>

本步驟為將對掌體（IX）進行水解後製造對掌體（VII）的步驟。

本反應可在溶劑中於鹼存在下進行。作為溶劑，雖無特別限定，例如可將甲醇、乙醇、丙醇、異丙醇、tert-丁醇等醇類或乙腈、四氫呋喃、二甲基亞砜、N,N-二甲基甲醯胺、N-甲基吡咯烷酮、二噁烷及水等單獨或組合後使用。作為溶劑，較佳可舉出醇類與水的組合，更佳可舉出乙醇與水之組合。溶劑之量雖無特別限定，對於化合物（IX）為10～100倍量（V/W），較佳為20～50倍量（V/W），更佳為30～40倍量（V/W）即可。

作為鹼，雖無特別限定，例如可使用氫氧化鋰、氫氧化鈉、氫氧化鉀等氫氧化鹼金屬類；碳酸鋰、碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸銨等碳酸鹼金屬類；氫氧化四甲基銨、氫氧化四乙基銨、氫氧化四丙基銨、氫氧化四丁基銨、氫氧化苯甲基三甲基銨（Triton B）等氫氧化四級銨等。作為鹼，較佳可舉出氫氧化鹼金屬類，更佳可舉出氫氧化鈉。鹼的量對於化合物（IX）而言，較佳為1.0～5.0莫耳當量，更佳為2.0～3.0莫耳當量即可。

反應溫度一般在0～100℃之範圍下進行即可，較佳為30～80℃，更佳為40～60℃。反應時間一般為5分鐘～48小

時爲佳，較佳爲30分鐘～12小時，特佳爲2～5小時。

<步驟 C>

本步驟爲縮合對掌體（VII）與醇（VIII），製造對掌體（VI）的步驟。醇（VIII）的量對於化合物（VII）而言爲0.8～2.0莫耳當量，較佳爲1.0～1.2莫耳當量即可。

本反應爲可在溶劑中，於鹼的存在下或非存在下使用縮合劑而進行。亦可在縮合促進劑的存在下進行反應。作爲溶劑雖無特別限定，例如可使用1,2-二氯乙烷、氯仿、二氯甲烷等鹵化烴類；乙酸乙酯、乙酸異丙基等乙酸酯類；甲苯、苯等芳香族烴類；四氫呋喃、二噁烷、乙腈、丙腈等。作爲溶劑，較佳可舉出鹵化烴類，更佳可舉出二氯乙烷。溶劑的量雖無特別限定，對於化合物（VII）而言爲5～100倍量（V/W），較佳爲10～20倍量（V/W）即可。

作爲鹼雖無特別限定，例如可使用吡啶、4-二甲基胺基吡啶（DMAP）、可立丁、盧剔啉、1,8-二吡雙環〔5.4.0〕月桂-7-烯（DBU）、1,5-二吡雙環〔4.3.0〕壬-5-烯（DBN）、1,4-二吡雙環〔2.2.2〕辛烷（DABCO）、三乙胺、二異丙基乙胺、二異丙基戊胺、三甲胺等有機鹼類；氫化鋰、氫化鈉、氫化鉀等氫化鹼金屬類；氫氧化鋰、氫氧化鈉、氫氧化鉀等氫氧化鹼金屬類；碳酸鋰、碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸銨等碳酸鹼金屬類；碳酸氫鈉、碳酸氫鉀等重碳酸鹼金屬等。

作為縮合促進劑，雖無特別限定，可使用 DMAP、1-羥基-7-偶氮苯並三唑（HOAt）、1-羥基苯並三唑（HOBt）、3,4-二氫-3-羥基-4-側氧-1,2,3-苯並三嗪（HODhbt）、N-羥基-5-降苡烯-2,3-二羧基醯亞胺（HONB）、五氟酚（HOPfp）、N-羥基酞醯亞胺（HOPht）、N-羥基琥珀醯亞胺（HOSu）等。作為縮合促進劑，以 DMAP 為佳。縮合促進劑的量對於化合物（VII）而言，以 0.001～1.0 莫耳當量為佳，較佳為 0.05～0.5 莫耳當量即可。

作為縮合劑，雖無特別限定，可使用二環己基碳二亞胺（DCC）、二異丙基碳二亞胺（DIPCI）、N-（3-二甲基胺基丙基）-N'-乙基-碳二亞胺（通稱：Water soluble carbodiimide：WSCl）、WSC·HCl 等。作為縮合劑，較佳為 WSC·HCl。縮合劑的量對於化合物（VII）而言為 1.0～3.0 莫耳當量，較佳為 1.0～1.2 莫耳當量。

反應一般在溫度 0～100℃ 的範圍下進行，較佳為 0～80℃，更佳為 10～30℃。反應時間一般為 5 分鐘～48 小時為佳，較佳為 30 分鐘～24 小時，特佳為 8～16 小時。

<步驟 D>

本步驟為藉由將對掌體（VI）的硫原子進行氧化而製造對掌體（IV）的步驟。

作為氧化方法，可使用將硫原子變換為磺醯基之一般方法。作為氧化劑，例如為可藉由使用觸媒量的鎢酸鈉、二氯化二氧化鉬或五氯化鉬的過氧化氫水之氧化反應，或

可使用過硼酸鈉、Oxone (註冊商標)、過碘酸鈉、過碘酸鉀、間氯過安息香酸 (mCPBA)、吡啶鎘氯鉻酸鹽 (PCC)、吡啶鎘二鉻酸鹽 (PDC)、N-氯琥珀酸醯亞胺 (NCS)、N-溴琥珀酸醯亞胺 (NBS)、N-碘琥珀酸醯亞胺 (NIS)、碘、溴等。作為氧化劑，較佳為五氯化鉬與過氧化氫水之組合。五氯化鉬的量對於化合物 (VI) 而言為 0.001 ~ 1.0 莫耳當量，較佳為 0.05 ~ 0.5 莫耳當量即可。過氧化氫水的量對於化合物 (VI) 而言為 1.0 ~ 10 莫耳當量，較佳為 4.0 ~ 6.0 莫耳當量。

作為溶劑雖無特別限定，例如可舉出水、甲醇、乙醇、異丙醇、tert-丁醇等醇類、乙腈、丙酮、四氫呋喃、二氯甲烷、氯仿、1,2-二氯乙烷、四氯化碳、N,N-二甲基甲醯胺、乙酸等。作為溶劑，較佳可舉出醇類，更佳可舉出 2-丙醇。溶劑的量雖無特別限定，對於化合物 (VI) 而言為 5 ~ 100 倍量 (V/W)，較佳為 10 ~ 30 倍量 (V/W)。

反應一般在溫度 0 ~ 100℃ 的範圍下進行，較佳為 10 ~ 60℃，更佳為 10 ~ 30℃。反應時間一般為 5 分鐘 ~ 48 小時為佳，較佳為 30 分鐘 ~ 24 小時，特佳為 8 ~ 16 小時。

<步驟 E>

本步驟為藉著由對掌體 (IV) 優先晶析出外消旋體優勢低光學純度之結晶，製造高光學純度的光學活性體 (V) 或 (V') 之步驟。

本步驟為在含有對掌體 (IV) 的溶劑中，晶析出外消

旋體優勢結晶後，除去所得之外消旋體優勢結晶，於母液中留下高光學純度的化合物（V）或（V'）之步驟。

作為溶劑，可舉出甲醇、乙醇、n-丙醇、異丙醇等醇類，以直鏈狀或支鏈狀碳數1~6的醇為佳，以乙醇、異丙醇為特佳。溶劑的量對於化合物（IV）而言為2~20倍量（V/W），較佳為4~10倍量（V/W），更佳為5~8倍量（V/W）。

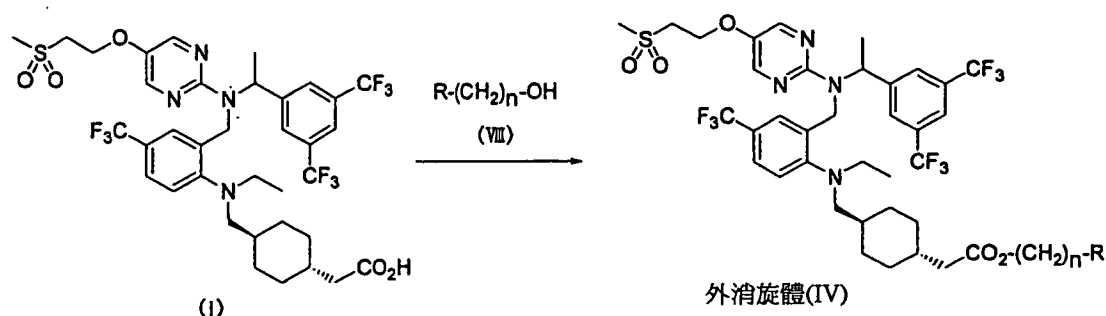
結晶化為將對掌體（IV）溶解於溶劑，在10~40℃，較佳為在15~20℃下，仔細攪拌30分鐘~2天，較佳為15~24小時，若要提高結晶收量，可繼續於溫度-10~10℃，較佳為-5~5℃下冷卻，並攪拌30分鐘~24小時，較佳為2~5小時。外消旋體優勢結晶可完全為外消旋體結晶，但一般為含有外消旋體成分60~100%程度的低光學純度（0~40%ee程度）之結晶。

本步驟可在另外調製的外消旋體之種晶存在下進行。於此所使用的外消旋體之種晶係為前述一般式（IV）所示化合物的外消旋體結晶，例如可舉出trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸苯甲基酯的外消旋體之結晶。

又，可將在本步驟E中所得之外消旋體優勢結晶直接作為外消旋體的種晶使用，但亦可將前述一般式（IV）所示化合物的外消旋體另外製造並結晶化所得之結晶，作為

外消旋體的種晶使用。該一般式 (IV) 所示化合物的外消旋體，例如可在下述所示方法製造。

[化17]



本反應為縮合外消旋體化合物 (I) 與醇 (VIII) 製造外消旋體 (IV) 者。醇 (VIII) 的量對於外消旋體化合物 (I) 而言以 0.8 ~ 2.0 莫耳當量為佳，較佳為 1.0 ~ 1.2 莫耳當量。

本反應為溶劑中，可在鹼存在下或非存在下使用縮合劑而進行。亦可在縮合促進劑的存在下進行反應。作為溶劑，雖無特別限定，例如可使用 1,2-二氯乙烷、氯仿、二氯甲烷等鹵化烴類；乙酸乙酯、乙酸異丙基等乙酸酯類；甲苯、苯等芳香族烴類；四氫呋喃、二噁烷、乙腈、丙腈等。作為溶劑，較佳可舉出鹵化烴類，更佳可舉出二氯甲烷。溶劑的量雖無特別限定，對於外消旋體化合物 (I) 而言以 5 ~ 100 倍量 (V/W) 為佳，較佳為 10 ~ 20 倍量 (V/W)。

作為鹼雖無特別限定，例如可使用吡啶、4-二甲基胺基吡啶 (DMAP)、可立丁、盧剔啶、1,8-二吡雙環 [5.4.0] 月桂-7-烯 (DBU)、1,5-二吡雙環 [4.3.0] 壬-5-烯 (DBN)、1,4-二吡雙環 [2.2.2] 辛烷 (DABCO)、三

乙胺、二異丙基乙胺、二異丙基戊胺、三甲胺等有機鹼類；氫化鋰、氫化鈉、氫化鉀等氫化鹼金屬類；氫氧化鋰、氫氧化鈉、氫氧化鉀等氫氧化鹼金屬類；碳酸鋰、碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸銨等碳酸鹼金屬類；碳酸氫鈉、碳酸氫鉀等重碳酸鹼金屬等。

作為縮合促進劑雖無特別限定，可使用 DMAP、1-羥基-7-偶氮苯並三唑基（HOAt）、1-羥基苯並三唑基（HOBt）、3,4-二氫-3-羥基-4-側氧-1,2,3-苯並三嗪（HODhbt）、N-羥基-5-降莖烯-2,3-二羧基醯亞胺（HONB）、五氟酚（HOPfp）、N-羥基酞醯亞胺（HOPht）、N-羥基琥珀醯亞胺（HOSu）等。作為縮合促進劑以 DMAP 為佳。縮合促進劑的量對於外消旋體化合物（I）而言以 0.001 ~ 1.0 莫耳當量為佳，較佳為 0.05 ~ 0.5 莫耳當量。

作為縮合劑雖無特別限定，可使用二環己基碳二亞胺（DCC）、二異丙基碳二亞胺（DIPCI）、N-（3-二甲基胺基丙基）-N'-乙基-碳二亞胺（通稱：Water soluble carbodiimide：WSCl）、WSC·HCl 等。作為縮合劑，較佳為 WSC·HCl。縮合劑的量對於外消旋體化合物（I）而言以 1.0 ~ 3.0 莫耳當量為佳，較佳為 1.0 ~ 1.2 莫耳當量。

反應一般在溫度 0 ~ 100℃ 的範圍下進行，較佳為 0 ~ 80℃，更佳為 10 ~ 30℃。反應時間一般為 5 分鐘 ~ 48 小時為佳，較佳為 30 分鐘 ~ 24 小時，特佳為 8 ~ 16 小時。

一般式（IV）所示化合物之外消旋體的結晶化（外消旋體的種晶之製造）可在與由對掌體（IV）的外消旋體優

勢結晶之優先晶析的同樣條件下進行。

即，將外消旋體（IV）溶解於溶劑，在 $10\sim 40^{\circ}\text{C}$ ，較佳為 $15\sim 20^{\circ}\text{C}$ ，進行30分鐘～2天，較佳為15～24小時攪拌即可，欲提高結晶的收量時，可進一步在溫度 $-10\sim 10^{\circ}\text{C}$ ，較佳為 $-5\sim 5^{\circ}\text{C}$ 下冷卻，進行30分鐘～24小時，較佳為2～5小時之攪拌。又，作為溶劑，可舉出甲醇、乙醇、n-丙醇、異丙醇等醇類，以直鏈狀或支鏈狀碳數1～6的醇為佳，以乙醇、異丙醇為特佳。溶劑的量對於外消旋體（IV）而言為2～20倍量（V/W），較佳為4～10倍量（V/W），更佳為5～8倍量（V/W）。

<步驟F>

本步驟為藉由將高光學純度的化合物（V）或（V'）進行脫保護而製造實質上純粹光學性（S）體化合物（III）或（R）體化合物（II）之步驟。

本反應可在溶劑中藉由使用金屬觸媒及使用氫源的接觸還原，或在溶劑中藉由使用鹼進行水解反應而進行。藉由接觸還原進行脫保護時，作為溶劑可使用甲醇、乙醇、異丙醇、tert-丁醇等醇類；二乙醚、四氫呋喃、二噁烷等醚類；乙酸乙酯、乙酸異丙基等乙酸酯類；乙酸；水等。作為溶劑，較佳為醇類，更佳為乙醇。溶劑的量對於化合物（V）或（V'）而言為5～30倍量（V/W），較佳為5～15倍量（V/W）。

作為氫源，例如可使用氫、環己二稀、甲酸、甲酸鉍

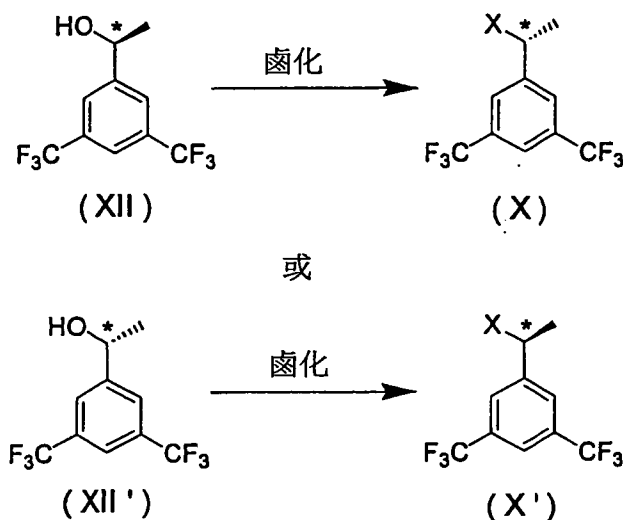
等。作為氫源以氫為佳。作為金屬觸媒，例如可使用鈀碳、鈀黑、雷尼鎳、二氧化鉑、鉑黑等。作為金屬觸媒以鈀碳為佳。鈀碳的量中作為10%Pd-C (wet) 的量對於化合物(V) 或 (V') 而言為0.001~0.5倍量(W/W)，較佳為0.05~0.2倍量(W/W)。

接觸還原一般在0~100℃的範圍下進行，較佳為10~60℃，更佳為10~30℃。反應時間一般以5分鐘~24小時為佳，更佳為30分鐘~16小時，特佳為1~6小時。

藉由水解反應進行脫保護時，作為溶劑並無特別限定，例如可將甲醇、乙醇、丙醇、2-丙醇、t-丁醇等醇類或乙腈、丙腈、四氫呋喃、二甲基亞砜、N,N-二甲基甲醯胺、N-甲基吡咯烷酮、二噁烷及水等以單獨或組合方式使用。作為鹼，雖無特別限定，例如可使用氫氧化鋰、氫氧化鈉、氫氧化鉀等氫氧化鹼金屬類；碳酸鋰、碳酸鈉、碳酸鉀、碳酸銨等碳酸鹼金屬類；氫氧化四甲基銨、氫氧化四乙基銨、氫氧化四丙基銨、氫氧化四丁基銨、氫氧化苯甲基三甲基銨 (Triton B) 等氫氧化四級銨等。

且，光學活性苯甲基鹵化物(X) 或 (X')，例如可藉由以下所示方法合成。

[化18]



本反應為將光學活性 1-〔3,5-雙(三氟甲基)苯基〕乙醇 (XII) 或 (XII') 在鹵化劑的存在下進行鹵化，在幾乎無降低光學純度下可高效率地製造光學活性 1-鹵-1-〔3,5-雙(三氟甲基)苯基〕乙烷 (X) 或 (X') 的步驟。

使用於本反應的鹵化劑可舉出氯化亞砷、三氯化磷、五氯化磷、氧氯化磷等氯化劑；三溴化磷、三溴化磷與溴化氫 (30% 乙酸溶液)、三溴化磷與吡啶、N-溴琥珀酸醯亞胺與二甲硫醚、N-溴琥珀酸醯亞胺與三苯基膦、1,2-二溴-1,1,2,2-四氯乙烷與三苯基膦、溴二甲基銻溴化物、吡啶鎘溴化物五溴化物與六甲基二矽烷、溴與三苯基膦、溴與三丁基膦、溴與二甲硫醚、溴化鋅與三苯基膦及偶氮二羧酸二甲基、溴化鋰與氯三甲基矽烷、溴化鋰與無水三氟乙酸、溴三甲基矽烷、四溴化碳與三苯基膦、硫醯二溴等溴化劑；碘化氫、碘化鉀與磷酸等碘化劑。鹵化劑為溴化劑時，較佳為三溴化磷與溴化氫 (30% 乙酸溶液)、1,2-二溴-1,1,2,2-四氯乙烷與三苯基膦、N-溴琥珀酸醯亞胺與

二甲硫醚。

以下對於作為鹵化劑使用三溴化磷與溴化氫的情況、及使用1,2-二溴-1,1,2,2-四氯乙烷與三苯基磷的情況做特別具體說明。

<作為鹵化劑使用三溴化磷與溴化氫（30%乙酸溶液）之情況>

作為鹵化劑使用三溴化磷與溴化氫（30%乙酸溶液）的情況為，三溴化磷對於苯基乙醇（XII）或（XII'）而言使用0.3～2.0莫耳當量，較佳為使用0.4～0.6莫耳當量。溴化氫對於苯基乙醇（XII）或（XII'）而言使用0.7～3.0莫耳當量，較佳為使用0.8～1.2莫耳當量。

本反應可在溶劑的存在下或非存在下進行。溶劑的存在下進行反應時，作為所使用的溶劑，若為與反應無關連者即可並無特別限定，例如可舉出苯、甲苯、二甲苯、均三甲苯、氯苯、1,2-二氯苯、硝基苯等芳香族烴類；n-戊烷、n-己烷、環己烷、n-庚烷、n-辛烷、n-癸烷等脂肪族烴類；二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、氯仿及四氯化碳等鹵化烴類等，其中亦以苯、甲苯、二甲苯、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、n-戊烷、n-己烷、n-庚烷為佳，特佳為甲苯、二氯甲烷、n-庚烷。又，這些溶劑可單獨或組合後使用，溶劑的使用量並無特別限定。

反應一般在溫度-50～150℃的範圍下進行，-20～80℃為較佳，0～15℃為特佳。反應時間一般為5分鐘～48小時

爲佳，30分鐘～36小時爲較佳，12～24小時爲特佳。

<作爲鹵化劑使用1,2-二溴-1,1,2,2-四氯乙烷與三苯基磷的情況>

作爲鹵化劑使用1,2-二溴-1,1,2,2-四氯乙烷與三苯基磷的情況爲，1,2-二溴-1,1,2,2-四氯乙烷對於苯基乙醇（XII）或（XII'）而言使用1.0～3.0莫耳當量，較佳爲使用1.0～1.2莫耳當量。三苯基磷對於苯基乙醇（XII）或（XII'）而言使用1.0～3.0莫耳當量，較佳爲使用1.0～1.2莫耳當量。

本反應可在溶劑的存在下進行。作爲所使用的溶劑，若爲對於反應無關連者即可，並無特別限定，例如可舉出苯、甲苯、二甲苯、均三甲苯、氯苯、1,2-二氯苯、硝基苯等芳香族烴類；n-戊烷、n-己烷、環己烷、n-庚烷、n-辛烷、n-癸烷等脂肪族烴類；二氯甲烷、1,2-二氯乙烷、氯仿及四氯化碳等鹵化烴類等。作爲溶劑，較佳可舉出芳香族烴類或鹵化烴類，更佳可舉出苯、甲苯、二甲苯、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷，特佳可舉出甲苯、二氯甲烷、1,2-二氯乙烷。又，這些溶劑可單獨或組合後使用。溶劑的使用量並無特別限定，對於苯基乙醇（XII）或（XII'）而言以1～10倍量（V/W）爲佳，較佳爲2～4倍量（V/W）。

反應一般在溫度-50～150℃之範圍下進行，-20～80℃爲較佳，0～30℃爲特佳。反應時間一般爲5分鐘～48小時

為佳，30分鐘～36小時為較佳，1～2小時為特佳。

(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物如下述實施例之具體記載，具有PCSK9 mRNA表現抑制作用，且具有PCSK9蛋白質量的降低作用及LDL受體量的增加作用，及具有可降低活體內之血中LDL膽固醇的作用。

本發明並未受限於下述推論，(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物因可抑制PCSK9蛋白質的產生，故抑制LDL受體之分解，使LDL受體的量增加，其結果促進血中LDL對於LDL受體的吸收。因此該血中LDL對於LDL受體的吸收促進，可推測成為可發揮血中LDL膽固醇值的降低作用之要因之一。

因此含有將(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分之醫藥或醫藥組成物，除作為高LDL血症以外，亦可作為脂質異常症（高脂血症）、動脈硬化症、粥狀性動脈硬化症、末梢血管疾病、高膽固醇血症、家族性高膽固醇血症、心臟血管障礙、狹心症、缺血症、心肌缺血症、血栓症、心肌梗塞、再灌流障礙、血管形成性再狹窄，或高血壓等疾病之預防及/或治療的醫藥。

又，已知PCSK9所屬之前蛋白轉換酶(PCs)為癌、肥胖、糖尿病、阿茲海默病，或病毒感染症中的發症、進行、及惡化等相關酵素，故對於含有(S)體化合物(III)，或其鹽，或彼等的溶劑合物作為有效成分的醫藥或醫藥組成物，可期待利用成為與上述PCs相關疾病的預防及/

或治療之醫藥。

另一方面，外消旋體化合物（I）、及專利文獻2 實施例44所記載的化合物（trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基] 乙基 } { 5- [2-（甲基硫代）乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4-（三氟甲基）苯基 }（乙基）胺基）甲基] 環己基 } 乙酸）如下述實施例之具體記載，具有HMG-CoA還原酵素 mRNA表現抑制作用。因此，外消旋體化合物（I）、專利文獻2 實施例44所記載之化合物或彼等之鏡像異構物，或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物可利用作為對於HMG-CoA還原酵素 mRNA表現所引起的疾病（例如所謂Ras、Rho、Rac的種種蛋白質之翻譯後進行脂質修飾的類異戊二烯（法呢基焦磷酸、二異戊二烯焦磷酸等）之產生所引起的疾病。具體為例如發炎、癌、阿茲海默病、骨質粗鬆症、前立腺肥大、絲球體疾病、寄生蟲感染、病毒感染、乾癬、黃斑變性等）的預防及/或治療之醫藥亦受到期待。

作為本發明的醫藥，可將上述有效成分本身進行投與，較佳為可將藉由斯業者熟知的方法所製造之經口用或非經口用的醫藥組成物進行投與。作為適用於經口投與之醫藥組成物，例如可舉出錠劑、膠囊劑、散劑、細粒劑、顆粒劑、液劑、及糖漿劑等，作為適用於非經口投與的醫藥組成物，例如可舉出靜脈內注射劑或肌肉內注射劑等注射劑、點滴劑、塞劑、吸入劑、點眼劑、點鼻劑、經皮吸收劑、經黏膜吸收劑等，但並未限定於此等。

上述醫藥組成物，可添加藥理學、製劑學上被許可得添加物而製造。作為藥理學、製劑學上被許可的添加物例子，例如可舉出賦形劑、結合劑、增量劑、崩壞劑、界面活性劑、滑澤劑、分散劑、緩衝劑、保存劑、矯味劑、香料、被膜劑、稀釋劑等，但並未限定於此等。

本發明的醫藥之投與量並無特別限定，可依據疾病種類、預防或治療之目的、有效成分種類等而做適宜選擇，且被和患者體重或年齡、症狀、投與經路等一般必須考慮之種種要因做適宜地增減。例如於經口投與之情況，成人每一天的有效成分之重量為 0.1 ~ 500mg 程度之範圍，投與量可由斯業者適宜地選擇，但並未限定於上述範圍。

【實施方式】

〔實施例〕

其次舉出實施例對本發明做進一步說明，但本發明並未限定於這些實施例。且，下述實施例中所使用的簡稱如下述意思。

s：單重態 (singlet)

d：二重態 (doublet)

t：三重態 (triplet)

q：四重態 (quartet)

m：複重態 (multiplet)

br：寬頻帶 (broad)

J：耦合定數 (coupling constant)

Hz：赫茲（Hertz）

CDCl₃：重氯仿

¹H-NMR：質子核磁共振

IR：紅外線吸收光譜

實施例 1：實質上純粹光學性（S）體化合物（III）之製造方法的確立

實施例 1-1：使用鏡像異構物層析管柱的光學分割

若在下述條件，可依據專利文獻 2（國際公開第 2008/129951 號說明書）實施例 45 所記載之方法，由所製造的外消旋體化合物（I）進行各鏡像異構物的分離，得知可使用藉由手性 HPLC 分析法的（S）體化合物（III）及（R）體化合物（II）之光學純度測定。且，本發明為提供使用下述手性 HPLC 分析條件（特別為下述管柱與下述移動相之組合）的外消旋體化合物（I）、（S）體化合物（III）或（R）體化合物（II），或彼等之鹽，或彼等的溶劑合物的光學純度測定方法。

管柱：CHIRALCEL OD-H

移動相：己烷/乙醇/TFA = 90/10/0.1

流速：1.0 mL/min

管柱溫度：40℃

檢測波長：242 nm

保持時間：第一波峰 / 21.3 min（（R）體）、第二波峰 / 23.7 min（（S）體）

然而，有關上述條件之移動相的溶劑中因含有 EtOH 與 TFA，故判斷與外消旋體化合物（I）及/或各鏡像異構物的羧酸進行反應而產生分解物（乙基酯體）。

因此，使用在上述條件的鏡像異構物層析管柱之光學分割法可使用於光學純度之測定（手性 HPLC 分析），但作為實質上純粹光學性各鏡像異構物之製造方法，特別為大規模製造方法並非適合。

實施例 1-2：藉由優先晶析法的實質上純粹光學性（S）體化合物（III）之製造

本發明者們所實施的藉由優先晶析法之實質上純粹光學性（S）體化合物（III）的製造方法概略如以下流程 5 所示。

且，各化合物的絕對配置，由步驟 1 所確認之（R）-1-溴-1-〔3,5-雙（三氟甲基）苯基〕乙烷的絕對配置進行判斷。

又，步驟 6 所得之（S）體化合物（III）（（S）-trans-〔4-〔（〔2-〔（〔1-〔3,5-雙（三氟甲基）苯基〕乙基〕〔5-〔2-（甲基磺醯基）乙氧基〕嘧啶-2-基〕胺基）甲基〕-4-（三氟甲基）苯基〕（乙基）胺基）甲基〕環己基〕乙酸）的光學純度藉由上述 1-1 所記載之條件的手性 HPLC 分析而決定。

且，在步驟 1 所得之 1-溴-1-〔3,5-雙（三氟甲基）苯基〕乙烷、在步驟 4 及 5 所得之 trans-〔4-〔（〔2-〔（〔1-

[3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 基 } { 5- [2- (甲 基 磺 醯 基) 乙 氧 基] 嘧 啶 -2-基 } 胺 基) 甲 基] -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲 基] 環 己 基 } 乙 酸 苯 甲 基 酯 的 光 學 純 度 藉 由 各 下 述 條 件 以 手 性 HPLC 分 析 決 定 。 且 本 發 明 為 提 供 使 用 下 述 手 性 HPLC 分 析 條 件 (特 別 為 下 述 管 柱 與 下 述 移 動 相 之 組 合) 的 各 化 合 物 , 或 彼 等 之 鹽 , 或 彼 等 的 溶 劑 合 物 之 光 學 純 度 測 定 方 法 。

1-溴 -1- [3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 烷 的 手 性 HPLC 分 析 條 件

管 柱 : CHIRALPAK AS-RH

移 動 相 : 乙 醇 / 水 = 60/40

流 速 : 0.5mL/min

管 柱 溫 度 : 25℃

檢 測 波 長 : 220nm

保 持 時 間 : 第 一 波 峰 /21.8min ((R) 體) 、 第 二 波 峰 /26.0min ((S) 體)

trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 基 } { 5- [2- (甲 基 磺 醯 基) 乙 氧 基] 嘧 啶 -2-基 } 胺 基) 甲 基] -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲 基] 環 己 基 } 乙 酸 苯 甲 基 酯 的 手 性 HPLC 分 析 條 件

管 柱 : CHIRALCEL OD-H

移 動 相 : 己 烷 / 乙 醇 = 80/20

流 速 : 1.0mL/min

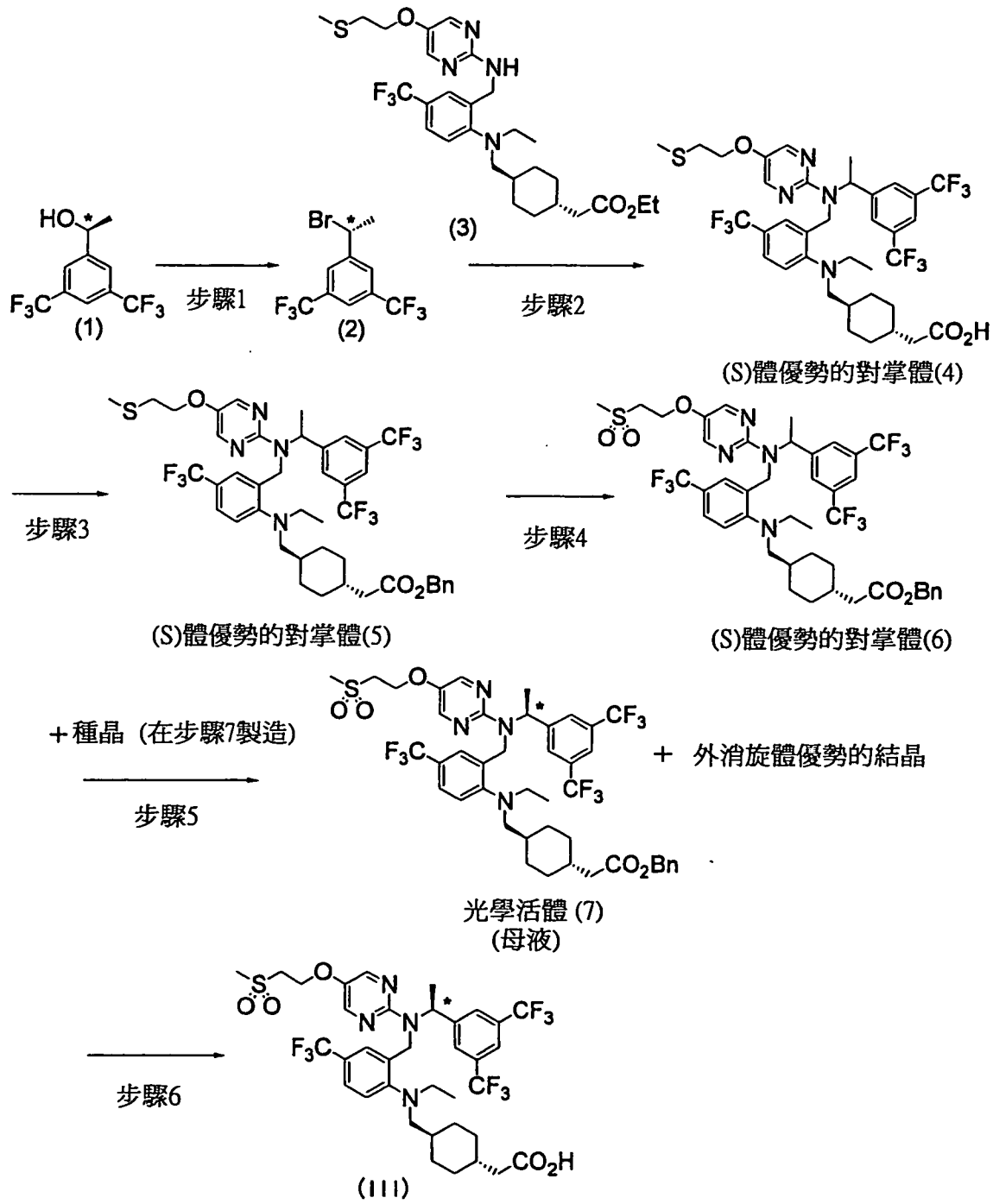
管 柱 溫 度 : 40℃

檢測波長：242nm

保持時間：第一波峰 / 11.3min ((R) 體) 、 第二波峰 / 13.0min ((S) 體)

流程 5

[化19]



(流程圖中，Et表示乙基，Bn表示苯甲基)

步驟 1：(R) -1-溴 -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷之製造

將 (R) -1-溴 -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷藉由下述 1- (a) 的方法製造，將該絕對配置如以下進行確認。即，將所得之 (R) -1-溴 -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷導入於 (S) -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙胺後，與販賣的絕對配置已知之 (S) -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙胺的標準品與比旋光度之實測值的符號進行比較後確認。

又，將 (R) -1-溴 -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷亦由另外下述 1- (b) 的方法製造。

1- (a)：(R) -1-溴 -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷之製造 其 1

在氬氣環境下，將 1,2-二溴 -1,1,2,2-四氯乙烷 (7.57 g、23.2 mmol) 溶解於甲苯 (12.5 mL)，在 0℃ 加入三苯基膦 (6.1 g、23.2 mmol)，進行 30 分鐘攪拌。於此將 (S) -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙醇 (1) (5.0 g、19.4 mmol、>99.5% ee) 的甲苯溶液 (12.5 mL) 在 0℃ 下經 10 分鐘以上滴入後，升溫至室溫，在同溫下進行 1 小時攪拌。於反應液中加入 n-己烷 (25 mL)，並以矽藻石過濾。將濾液以水、飽和碳酸氫鈉、飽和食鹽水的順序洗淨，以

硫酸鈉乾燥後減壓餾去。將所得之殘渣進行減壓蒸餾（ 56°C 、 0.7 mmHg ）後得到 5.52 g 的（*R*）-1-溴-1-[3,5-雙（三氟甲基）苯基]乙烷（2）的無色油狀物（產率：88.6%）。

手性 HPLC 分析：光學純度 $>99.5\% \text{ ee}$ （主波峰：第一波峰）、轉化率 $\geq 99\%$

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} +59.1$ （ $c = 1.03, \text{CHCl}_3$ ）

$^1\text{H-NMR}$ （ CDCl_3 ） δ ：2.08（3H, d, $J = 7.1\text{ Hz}$ ），5.21（1H, q, $J = 7.1\text{ Hz}$ ），7.81（1H, s），7.87（2H, s）

（*R*）-1-溴-1-[3,5-雙（三氟甲基）苯基]乙烷的絕對配置之確認

於在上述 1-（a）所得之（*R*）-1-溴-1-[3,5-雙（三氟甲基）苯基]乙烷（2）（ 106 mg 、 0.336 mmol 、 $99\% \text{ ee}$ ）的 *N,N*-二甲基甲醯胺溶液（ 1 mL ）中加入疊氮化鈉（ 64.4 mg 、 0.990 mmol ），並在 $-18 \sim -15^{\circ}\text{C}$ 進行 4 小時攪拌。將反應溶液以乙酸乙酯/*n*-己烷（1：1）及水進行萃取，將有機層以飽和食鹽水洗淨，以無水硫酸鈉進行乾燥並減壓濃縮後，得到 111.5 mg 之 1-[3,5-雙（三氟甲基）苯基]乙基疊氮化物（粗生成物： 111.5 mg ）。

$^1\text{H-NMR}$ （ CDCl_3 ） δ ：1.61（3H, d, $J = 6.8\text{ Hz}$ ），4.79（1H, q, $J = 6.8\text{ Hz}$ ），7.78（2H, s），7.84（1H, s）

將所得之 1-[3,5-雙（三氟甲基）苯基]乙基疊氮化物（粗生成物： 111.5 mg ）溶解於甲醇（ 6 mL ），加入鈹-

絲纖維蛋 (18mg) 並以氫氣取代，在室溫下進行 1 小時攪拌。以矽藻石過濾，將濾液減壓濃縮後所得之殘渣以矽膠管柱層析 (氯仿 : 甲醇 = 50 : 1 ~ 5 : 1) 進行純化後得到 77.6mg 的 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙胺的無色油狀物 (產率 : 91%、2 步驟)。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.42 (3H, d, $J = 6.8\text{Hz}$) , 1.58 (2H, br-s) , 4.30 (1H, q, $J = 6.8\text{Hz}$) , 7.75 (1H, s) , 7.85 (2H, s)

所得之 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙胺的比旋光度如下所示。

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -15.9$ ($c = 1.31, \text{CHCl}_3$)

另一方面，販賣的標準品 ((S) -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙胺 (Central Glass co., LTD. 製 : Lot.0102000 : 光學純度 : 99%ee)) 之比旋光度如下所示。

$[\alpha]_{\text{D}}^{25} -15.9$ ($c = 1.15, \text{CHCl}_3$)

比旋光度的實測值之符號與販賣的標準品之符號一致，可確認所得之 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙胺為 (S) 體。而該胺經由疊氮化物離子的求核取代反應由 1-溴-1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷得到故可確認上述 1- (a) 所得之 1-溴-1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷為 (R) 體。

1- (b) : (R) -1-溴-1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷

之製造 其2

在氬氣環境下，將 (S) -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙醇 (1) (300g、1.16mol、96%ee) 於水浴下，在 20℃ 以下滴入三溴化磷 (157.3g、0.58mol)，在 19~22℃ 進行 30 分鐘攪拌。將反應液冷卻後，在 0℃ 以下滴入溴化氫 (30%乙酸溶液) (228mL、1.16mol)，在 13~15℃ 進行 16 小時攪拌。將反應液注入於冰水後以 n-己烷 (3L×2) 萃取。合併有機層，以飽和碳酸氫鈉 (3L)、飽和食鹽水 (3L) 的順序洗淨，以無水硫酸鎂乾燥後，減壓下 (90~100mmHg) 濃縮，得到 389.2g 之粗體。將所得之粗體以管柱層析 (矽膠 900g、展開溶劑：n-己烷) 進行純化後得到 349.8g 之 (R) -1-溴-1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷 (2) 的無色油狀物 (產率 93.8%)。

且，對於如下述的手性 HPLC 分析，由第一波峰作為主波峰顯現，可確認在 1- (b) 所製造之 1-溴-1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷亦與 1- (a) 同樣地為 (R) 體。

手性 HPLC 分析：光學純度 >93.9%ee (主波峰：第一波峰)、轉化率 97.8%

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.08 (3H,d,J = 7.1Hz) , 5.21 (1H,q,J = 7.1Hz) , 7.81 (1H,s) , 7.87 (2H,s)

步驟 2：trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基硫代) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲

基〕環己基〕乙酸的 (S) 體優勢對掌體之製造

在氬氣環境下，於藉由專利文獻 2 (國際公開第 2008/129951 號說明書) 所記載的方法所合成之 *trans*- [4- ([(乙基) { 2- [({ 5- [2- (甲基硫代) 乙氧基] 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } 胺基] 甲基) 環己基] 乙酸乙酯 (3) (565.4 g、0.99 mol) 的無水四氫呋喃 (THF、2.26 L) 溶液中，冰冷下加入 NaH (60% in oil、119 g、2.98 mol)，室溫中進行 1 小時攪拌。將反應液冷卻至 -30℃，滴入在步驟 1 所得之 (R) -1-溴 -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙烷 (2) (682 g、1.99 mol、93.9% ee) 的無水 N,N-二甲基甲醯胺 (4.53 L) 溶液至反應系內成為 -15℃ 以下，在 -15℃ ~ -1℃ 進行 5 小時攪拌。將反應液注入於冰水 (35 L) 與甲苯 (30 L) 之混合溶液中，加入檸檬酸至 pH 為 6.9 並分離有機層。

將水層以甲苯 (20 L) 進行 2 次萃取，合併有機層，以無水硫酸鎂乾燥後減壓濃縮得到粗體。將粗體溶解於乙醇 (8 L)，冰冷下加入 2 M NaOH 水溶液 (1.24 L、2.48 mol)，在 50℃ 進行 3.5 小時攪拌。於反應液在冰冷下加入 1 M HCl 水溶液至 pH 5.4，注入於水 (25 L)，以乙酸乙酯 (22 L) 進行 2 次萃取。將有機層以飽和食鹽水 (12 L) 洗淨，以無水硫酸鎂乾燥後減壓濃縮，將所得之殘渣以管柱層析 (矽膠 21 g、展開溶劑：庚烷 / 丙酮 = 7/1 → 3/1) 進行純化後得到 *trans*- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基硫代) 乙氧基] 嘧啶 -2-基 } 胺

基) 甲基] -4-(三氟甲基) 苯基] (乙基) 胺基) 甲基] 環己基] 乙酸的對掌體 (4) (黃色油狀物、744.1g、產率 96%)。

且，如上述步驟 1 所記載，將確認為絕對配置的 (R) -1-溴-1-[3,5-雙(三氟甲基) 苯基] 乙烷 (2) 作為原料使用，因進行藉由胺 (3) 之求核取代反應，故所得之對掌體 (4) 係以 (S) 體為優勢。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.85-0.96 (7H, m), 1.35-1.45 (4H, m), 1.60-1.78 (5H, m), 2.18-2.21 (5H, m), 2.69 (1H, m), 2.81-2.91 (5H, m), 4.16 (2H, q, $J = 6.8\text{Hz}$), 4.61 (1H, d, $J = 17.1\text{Hz}$), 4.85 (1H, d, $J = 17.1\text{Hz}$), 6.22 (1H, q, $J = 6.8\text{Hz}$), 7.11 (1H, d, $J = 8.6\text{Hz}$), 7.23 (1H, s), 7.37 (1H, d, $J = 8.3\text{Hz}$), 7.70 (1H, s), 7.73 (2H, s), 8.14 (2H, s)

步驟 3: trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙(三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2-(甲基硫代) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4-(三氟甲基) 苯基] (乙基) 胺基) 甲基] 環己基] 乙酸苯甲基酯的 (S) 體優勢對掌體之製造

在氬氣環境下，於在步驟 2 所得之 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙(三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2-(甲基硫代) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4-(三氟甲基) 苯基] (乙基) 胺基) 甲基] 環己基] 乙酸的 (S) 體優勢對掌體 (4) (744.1g、0.95mol) 之無水二氯乙

烷 (11.6L) 溶液中 , 冰冷下加入苯甲基醇 (113.1g 、 1.05mol) 、 WSC · HCl (200.5g 、 1.05mol) 及 DMAP (11.9g 、 98mmol) , 在室溫進行過夜攪拌。於反應液加入水 (10L) , 以氯仿 (19L 、 14L) 萃取 , 將有機層以飽和食鹽水 (12L) 洗淨 , 以無水硫酸鎂乾燥後減壓濃縮 , 將所得之殘渣以管柱層析 (矽膠 28g 、 展開溶劑 : 庚烷 / 乙酸乙酯 = 6/1) 進行純化後得到 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基硫代) 乙氧基] 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸苯甲基酯之對掌體 (5) (黃色油狀物 、 745.8g 、 產率 90%) 。

且 , 所得之對掌體 (5) 與對掌體 (4) 同樣地係以 (S) 體為優勢。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87-0.95 (7H,m) , 1.37 (1H,m) , 1.43 (3H,d,J = 7.1Hz) , 1.65-1.77 (5H,m) , 2.20 (2H,d,J = 6.8Hz) , 2.22 (3H,s) , 2.66-2.71 (2H,m) , 2.82-2.91 (4H,m) , 4.15 (2H,t,J = 6.6Hz) , 4.62 (1H,d,J = 17.1Hz) , 4.85 (1H,d,J = 17.1Hz) , 5.10 (2H,s) , 6.21 (1H,q,J = 7.1Hz) , 7.10 (1H,d,J = 8.3Hz) , 7.22 (1H,s) , 7.28-7.38 (6H,m) , 7.70 (1H,s) , 7.73 (2H,s) , 8.14 (2H,s)

步驟 4 : trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶 -2-

基 } 胺基) 甲基 } -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基 } 環己基 } 乙酸苯甲基酯的 (S) 體優勢對掌體之製造

在氫氣環境下，於在步驟3所得之 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基硫代) 乙氧基] 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基 } 環己基 } 乙酸苯甲基酯的 (S) 體優勢對掌體 (5) (745.8 g、0.87 mol) 之 2-丙醇 (15.2 L) 溶液中加入五氯化鉬 (31.3 g、87.3 mmol) 及 30% 過氧化氫水 (496 mL、4.38 mol)，在室溫進行 5 小時攪拌。將反應液以飽和亞硫酸氫鈉水溶液 (3.1 L) 驟冷後加入水 (15 L)，以氯仿 (14 L、12 L) 萃取，將有機層以飽和食鹽水 (20 L) 洗淨，以無水硫酸鎂乾燥後減壓濃縮，將所得之殘渣以管柱層析 (矽膠 26 kg、展開溶劑：庚烷 / 乙酸乙酯 = 3/1 → 2/1) 進行純化後得到 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基 } 環己基 } 乙酸苯甲基酯的對掌體 (6) (黃色非晶體、619.5 g、產率 79%)。

且所得之對掌體 (6) 與對掌體 (4) 及對掌體 (5) 同樣地以 (S) 體為優勢。

手性 HPLC 分析：光學純度 67.7% ee (主波峰：第二波峰)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0.87-0.96 (7H, m)，1.38 (1H, m)，1.45 (3H, d, $J = 7.1 \text{ Hz}$)，1.65-1.80 (5H, m)，2.21 (

2H,d,J = 6.6Hz) , 2.69 (1H,m) , 2.81-2.91 (3H,m) ,
 3.08 (3H,s) , 3.44 (2H,t,J = 5.4Hz) , 4.44 (2H,t,J =
 5.4Hz) , 4.64 (1H,d,J = 17.1Hz) , 4.86 (1H,d,J =
 17.3Hz) , 5.10 (2H,s) , 6.19 (1H,q,J = 6.9Hz) , 7.12
 (1H,d,J = 8.3Hz) , 7.19 (1H,s) , 7.30-7.39 (6H,m) ,
 7.71 (1H,s) , 7.72 (2H,s) , 8.16 (2H,s)

步驟5：實質上純粹光學性 (S) -trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸苯甲基酯之製造

將在步驟4所得之 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸苯甲基酯的 (S) 體優勢對掌體 (6) (111.7g、123.7mmol、67.7%ee) 溶解於乙醇 (825mL) , 將另外調製之種晶 (在下述步驟7所製造之外消旋體結晶) 2.0mg 在 15℃ ~ 20℃ 下加入 , 在同溫下進行 21 小時攪拌 , 在 0℃ 進行 3 小時攪拌。過濾分離析出物 , 以冷乙醇 (165mL) 洗淨後 , 將母液藉由減壓濃縮 , 得到實質上純粹光學性 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (

乙基)胺基)甲基)環己基}乙酸苯甲基酯(7)(黃色非晶體、66.38g、產率59%)。

且所得之 *trans*-{4-[(2-[(1-[3,5-雙(三氟甲基)苯基)乙基]{5-[2-(甲基磺醯基)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基]-4-(三氟甲基)苯基}(乙基)胺基)甲基)環己基}乙酸苯甲基酯(7)係由(S)體優勢對掌體(6)過濾分離出外消旋體優勢結晶而得故為(S)體。

手性 HPLC 分析：光學純度 >99% ee (主波峰：第二波峰)

$[\alpha]_D^{20} -42.36$ (c = 1.0 w/v%, CHCl₃)

且過濾分離後的外消旋體優勢結晶之光學純度在手性 HPLC 分析之結果為 22% ee (43.39g、產率 39%)。

步驟 6：實質上純粹光學性 (S) -*trans*-{4-[(2-[(1-[3,5-雙(三氟甲基)苯基)乙基]{5-[2-(甲基磺醯基)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基]-4-(三氟甲基)苯基}(乙基)胺基)甲基)環己基}乙酸之製造

在氮氣環境下，於在步驟 5 所得之 (S) -*trans*-{4-[(2-[(1-[3,5-雙(三氟甲基)苯基)乙基]{5-[2-(甲基磺醯基)乙氧基]嘧啶-2-基}胺基)甲基]-4-(三氟甲基)苯基}(乙基)胺基)甲基)環己基}乙酸苯甲基酯(7) (34.2g、37.88mmol、>99% ee) 的乙醇 (340mL) 溶液，加入 10% Pd-C (wet) (3.4g)，經氫氣取代後，在室溫進行 2 小時攪拌。將反應懸濁液以矽藻石

過濾，以乙醇（50mL）洗淨，將洗液藉由減壓濃縮，得到實質上純粹光學性 *trans*- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基] 乙基 } { 5- [2-（甲基磺醯基）乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4-（三氟甲基）苯基 } （乙基）胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸（III）（白色非晶體、31.78g、產率100%）。

且，所得之化合物如下述比旋光度所示，其為左旋性化合物。又，所得之化合物係為藉由（S）體之苯甲基酯（7）經酯進行脫保護而得者，故同樣為（S）體。

手性 HPLC 分析：光學純度 >99% ee（主波峰：第二波峰）

$[\alpha]_D^{20}$ -46.68（ $c = 1.0$, CHCl₃）

IR（ATR）cm⁻¹：2921，1706，1479，1279，1134

¹H-NMR（CDCl₃） δ ：0.80-0.96（7H,m），1.38（1H,m），1.47（3H,d,J = 7.1Hz），1.65-1.77（5H,m），2.19（2H,d,J = 6.8Hz），2.72（1H,m），2.81-2.91（3H,m），3.08（3H,s），3.45（2H,t,J = 5.2Hz），4.44（2H,q,J = 5.4Hz），4.62（1H,d,J = 17.1Hz），4.86（1H,d,J = 17.4Hz），6.21（1H,q,J = 7.1Hz），7.13（1H,d,J = 8.3Hz），7.19（1H,s），7.38（1H,d,J = 6.6Hz），7.71（1H,s），7.73（2H,s），8.15（2H,s）

步驟 7： *trans*- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基] 乙基 } { 5- [2-（甲基磺醯基）乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4-（三氟甲基）苯基 } （乙基）胺基)

甲基〕環己基〕乙酸苯甲基酯的外消旋體種晶之製造

於藉由專利文獻2（國際公開第2008/129951號說明書）實施例45所記載的方法所合成之trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基〕乙基〕 { 5- [2-（甲基磺醯基）乙氧基〕嘧啶-2-基〕胺基）甲基〕-4-（三氟甲基）苯基〕（乙基）胺基）甲基〕環己基〕乙酸（外消旋體化合物（I））（20g、24.61mmol）的無水二氯甲烷（200mL）溶液中，冰冷下加入苯甲基醇（2.93g、27.07mmol）、DMAP（300mg、2.46mmol）及WSC·HCl（5.19g、27.07mmol），升溫至室溫，進行16小時攪拌。於反應液加入水（100mL），以氯仿（500mL）萃取，將有機層以2M 鹽酸水溶液（100mL）及飽和食鹽水（100mL）洗淨，以無水硫酸鎂進行乾燥後減壓濃縮，將所得之殘渣以管柱層析（矽膠 350g、展開溶劑：N-己烷/乙酸乙酯 = 3/1→1/1）進行純化後得到trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基〕乙基〕 { 5- [2-（甲基磺醯基）乙氧基〕嘧啶-2-基〕胺基）甲基〕-4-（三氟甲基）苯基〕（乙基）胺基）甲基〕環己基〕乙酸苯甲基酯（21.15g、產率95.2%）之白色非晶體。

將所得之白色非晶體的trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基〕乙基〕 { 5- [2-（甲基硫代）乙氧基〕嘧啶-2-基〕胺基）甲基〕-4-（三氟甲基）苯基〕（乙基）胺基）甲基〕環己基〕乙酸苯甲基酯（7.9g）溶解於乙醇（40mL），將在室溫進行15小時攪拌後所得之

析出物進行過濾取出，以冷乙醇（20mL）洗淨，在60℃進行4小時減壓乾燥後得到 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基] 乙基 } { 5- [2-（甲基磺醯基）乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4-（三氟甲基）苯基 }（乙基）胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸苯甲基酯之外消旋體結晶（白色結晶性粉末、6.98g、回收率88.4%）。

實施例2：（S）體化合物（III）對於PCSK9蛋白質量、LDL受體量之影響的確認

於人類肝癌細胞株之HepG2細胞中添加被驗化合物，進行48小時培養後的PCSK9蛋白質量及LDL受體（LDLR）量以西方墨點法進行測定後，確認被驗化合物對於PCSK9蛋白質量、LDL受體量造成影響。

即，將HepG2細胞於6孔盤以 5×10^5 cells/well的濃度進行播種並一晚培養後，添加對培養液為1000分之1倍量的溶解於二甲基亞砷（DMSO）之被驗化合物，或僅DMSO。將細胞在CO₂ 恆溫培養機中於37℃進行48小時培養後，添加RIPA緩衝液（50mM Tris-HCl、pH7.8、150mM NaCl、1% NP-40、0.5% sodium deoxycholate、0.1% SDS、proteinase inhibitor）100μL，並使其破碎萃取蛋白質。將萃取的蛋白質以10000×g進行離心後，回收澄清液，加入SDS取樣緩衝液（60mM Tris-HCl、pH6.8、2% SDS、10% Glycerol、3% 氫硫乙醇），以使用8%丙烯醯胺凝膠的SDS-PAGE（SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳法）進行分離。分

離終了後，使用 iBlotGel Transfer System (Invitrogen 公司) ，於硝基纖維膜固定蛋白質，使用 BLOCK ACE (DS PHARMA BIOMEDICAL CO.,LTD.、目錄號碼 UK-B 80) 進行 blocking。

PCSK9 蛋白質、LDLR、 β -Actin 蛋白質的檢測及量之測定各於 1 次抗體使用 Anti-PCSK9 (Cayman 公司、目錄號碼 1000718) 、 Anti-LDLR (BioVision 公司、目錄號碼 3839-100) 或 Anti- β -Actin (Sigma 公司、目錄號碼 A5316) ，於 2 次抗體使用 Anti-Rabbit IgG-HRP (Sigma 公司、目錄號碼 A0545) 或 Anti-Mouse IgG-HRP (Sigma 公司、型錄號碼 A4416) ，將薄膜上的蛋白質以抗體標識，將化學發光試藥 (HRP 的基質) 與薄膜上的 2 次抗體進行反應後，使用 Lumino-image Analyzer LAS-3000 (富士底片股份有限公司製) 測定訊息強度而進行。所得之訊息強度使用影像解析軟體 Science Lab 2002 Multi Gauge (富士底片股份有限公司製) 使其數值化。

將所得之 PCSK9 蛋白質量及 LDL 受體量的測定值在各被驗化合物添加取樣及對照組取樣 (僅添加 DMSO 之取樣) 之間，將 β -Actin 蛋白質量作為指標進行修正。將修正後的各被驗化合物添加取樣之 PCSK9 蛋白質量及 LDL 受體量各以作為對照組取樣之 PCSK9 蛋白質量及 LDL 受體量各為 1 時的相對值記載。

將結果如表 1 所示。

且，作為被驗化合物，使用以下者。

1：將 (S) -trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 基 } { 5- [2- (甲 基 磺 醯 基) 乙 氧 基] 嘧 啶 -2-基 } 胺 基) 甲 基] -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲 基] 環 己 基 } 乙 酸 ((S) 體 化 合 物 (III))

(S) 體 化 合 物 (III) (光 學 純 度 >99% ee) 添 加 於 培 養 液 至 最 終 濃 度 為 10 μ M 。

2：將 (R) -trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 基 } { 5- [2- (甲 基 磺 醯 基) 乙 氧 基] 嘧 啶 -2-基 } 胺 基) 甲 基] -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲 基] 環 己 基 } 乙 酸 ((R) 體 化 合 物 (II))

(R) 體 化 合 物 (II) (光 學 純 度 ≥ 98% ee) 添 加 於 培 養 液 至 最 終 濃 度 10 μ M 。

3：將 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯 基] 乙 基 } { 5- [2- (甲 基 磺 醯 基) 乙 氧 基] 嘧 啶 -2-基 } 胺 基) 甲 基] -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲 基] 環 己 基 } 乙 酸 (外 消 旋 體 化 合 物 (I))

外 消 旋 體 化 合 物 (I) 添 加 於 培 養 液 至 最 終 濃 度 10 μ M 。

[表 1]

被驗化合物	用量 (μM：培養液中之 濃度)	PCSK9蛋白質量 (將對照組作為1時的 相對值)	LDL受體量 (將對照組作為1時 的相對值)
(S)體化合物(III)	10	0.28	1.73
(R)體化合物(II)	10	1.05	0.93
外消旋體化合物(I)	10	0.68	0.73

由表 1 所記載的結果可明瞭，對於與對照組之比較，即使（S）體化合物（III）可顯著降低 PCSK9 蛋白質量，可顯著增加 LDL 受體量，

對於（R）體化合物（II）及外消旋體化合物（I）幾乎未見到該作用。特別對於 LDL 受體量，與對照組之比較中，僅（S）體化合物（III）可顯著使其增加。

由以上試驗結果得知，（S）體化合物（III）具有 PCSK9 蛋白質量之降低作用、LDL 受體量之增加作用。

且，本發明並未限定於以下的推論，即使外消旋體化合物（I）為含有約 50% 的（S）體化合物（III）者，幾乎無顯示 PCSK9 蛋白質量之降低作用，又完全無顯示 LDL 受體量的增加作用，故對於外消旋體化合物（I），推論該構成成分之（R）體化合物（II）會阻礙（S）體化合物（III）之作用表現。而提高（S）體化合物（III）的光學純度，減少（R）體化合物（II）之含有量，特別推論為可增高 LDL 受體量之增加作用故較佳。

實施例 3：（S）化合物（III）對 PCSK9 mRNA 表現之影響的確認

欲確認在上述實施例 2 所確認之 PCSK9 蛋白質量的降低作用之機制，於 HepG2 細胞添加被驗化合物，將經 24 小時培養後的 PCSK9 mRNA 表現量藉由定量實時（real time）PCR 法進行確認。

即將 HepG2 細胞於 24 孔盤以 2×10^5 cells/well 的濃度進

行播種，進行一晚培養後，加入對於培養液為1000分之一倍量的溶解於二甲基亞砷（DMSO）之被驗化合物，或僅DMSO。將細胞在CO₂恆溫培養機進行37℃之24小時培養後，加入ISOGEN（Nippongene公司、目錄號碼31-02501）500μL，萃取total RNA。由萃取之total RNA使用High Capacity cDNA Reverse Transcription kit（Applied Biosystems公司、目錄號碼4368813），合成cDNA。人類PCSK9 mRNA表現量為使用對人類PCSK9為專一性之引子（Kourimate S. et.al., J Biol Chem. Vol.283, p9666）及Fast SYBR Green master mix（Applied Biosystems公司、目錄號碼4385614），藉由定量實時PCR法進行測定。作為測定機器使用7900HT Fast Realtime PCR system。

將所得之PCSK9 mRNA表現量的測定值在被驗化合物添加取樣（3取樣）及對照組取樣（僅添加DMSO之取樣：3取樣）之間，將β-Actin mRNA的表現量修正為指標。將修正後之被驗化合物添加取樣的PCSK9 mRNA表現量以將對照組取樣的PCSK9 mRNA表現量之平均值作為1時的相對值（平均值±標準誤差）記載。

將結果如表2所示。

且，作為被驗化合物使用以下者。

1：將（S）-trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙（三氟甲基）苯基] 乙基 } { 5- [2-（甲基磺醯基）乙氧基] 嘧啶-2-基 } 胺基) 甲基] -4-（三氟甲基）苯基 }（乙基）胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸（（S）體化合物（III））

(S) 體化合物 (III) (光學純度 >99% ee) 添加於培養液中至最終濃度 10 μ M。

[表 2]

被驗化合物	用量 (μ M : 培養液中之濃度)	PCSK9 mRNA表現量 (將對照組的平均值作為1時的相對值)
(S)體化合物(III)	10	0.18 $\pm$ 0.13

由表 2 所記載之結果得知，與對照組進行比較下，(S) 體化合物 (III) 顯示顯著降低 PCSK9 mRNA 的表現量。

因此，在實施例 2 經確認的 (S) 體化合物 (III) 所具有的 PCSK9 蛋白質量之降低作用的至少一部份係以 PCSK9 基因發現抑制作用為準者，推測 (S) 體化合物 (III) 具有 PCSK9 蛋白質之產生抑制作用。

實施例 4：(S) 體化合物 (III) 的血中 LDL 膽固醇降低作用之檢討

將 (S) -trans- { 4- { ({ 2- { ({ 1- { 3,5-雙 (三氟甲基) 苯基 } 乙基 } { 5- { 2- (甲基磺醯基) 乙氧基 } 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基 } -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基 } 環己基 } 乙酸 ((S) 體化合物 (III) : 光學純度 >99% ee) 懸浮於 0.5% 甲基纖維素溶液後，對於正常倉鼠 (雄性 Syrian Hamster) 使用金屬管進行 1 天 1 次經 14 天的反覆經口投與。最終投與的 4 小時後採血液得到血漿。血漿中之脂蛋白質的分析依據 J. Lipid. Res., 43, p805-

814所記載之方法，使用後標籤法（post-labeling method）藉由HPLC系統以自動測定方式進行。即，將血漿取樣15 μ L以含有1mM EDTA之PBS進行10倍稀釋後，於連接HPLC系統（送液單元：Shimadzu LC-20A system、島津製作所）的凝膠過濾管柱（Superose6管柱（管柱尺寸：10 $\times$ 300mm）、GE HEALTHCARE JAPAN CORPORATION製）注入80 μ L。使用泳動緩衝液（Running Buffer）之含有1mM EDTA之PBS，以流速0.5mL/min，管柱溫度40 $^{\circ}$ C下進行分離。對於由管柱的溶離液，將膽固醇測定試藥（膽固醇E TEST WAKO、和光純藥工業公司製）以流速0.25mL/min下混合，在反應管（0.5mm $\times$ 15m）中於送液下在40 $^{\circ}$ C進行反應。將由反應管之溶離液中的膽固醇以波長600nm進行檢測。求得所得之膽固醇的波峰總面積中LDL部分面積所佔比率，預先使用膽固醇E TEST WAKO進行測定的總膽固醇量乘以LDL部分的面積比率，算出LDL膽固醇量。

且，對於各對照組群（0.5%甲基纖維素溶液投與群）、被驗化合物投與群（（S）體化合物（III）10mg/kg體重、30mg/kg體重投與群），使用預先以血漿總膽固醇值作為指標進行群分離的6隻正常倉鼠。

各群的血漿中之LDL膽固醇量（LDL-C、mg/dl）如表3所示。且，表3中之*符號及***符號各表示在各對照組群與被驗化合物投與群之間所進行的多群比較檢定（Dunnett之多重比較檢定）的結果，在危險率5%以下（

$p < 0.05$) 、 及 危 險 率 0.1% 以 下 ($p < 0.001$) 顯 示 有 優 勢 差 。 又 被 驗 化 合 物 投 與 群 中 , 將 對 於 對 照 組 群 之 LDL 膽 固 醇 量 的 降 低 率 , 作 為 LDL 膽 固 醇 降 低 率 藉 由 下 述 計 算 式 1 算 出 並 以 % 表 示 。

LDL 膽 固 醇 降 低 率 (%) = [(對 照 組 群 之 平 均 LDL 膽 固 醇 量 - 各 化 合 物 投 與 群 之 平 均 LDL 膽 固 醇 量) / 對 照 組 群 之 平 均 LDL 膽 固 醇 量] $\times 100$ (計 算 式 1)

[表 3]

化 合 物	用 量 (mg/kg)	平均LDL膽固醇量 $\pm$ 標準 偏差(mg/dl)	LDL膽固醇降低率(%)
對照組	-	50 $\pm$ 3.0	-
(S)體化合物(III)	10	40 $\pm$ 2.6 [*]	20.0
	30	31 $\pm$ 2.6 ^{***}	38.0

由 表 3 所 記 載 之 結 果 得 知 , (S) 體 化 合 物 (III) 具 有 優 良 血 中 LDL 膽 固 醇 降 低 作 用 。

由 以 上 試 驗 結 果 得 知 , (S) 體 化 合 物 (III) 可 作 為 具 有 血 中 LDL 降 低 作 用 之 醫 藥 的 有 效 成 分 等 使 用 。

實 施 例 5 : 外 消 旋 體 化 合 物 (I) 等 對 HMG-CoA 還 原 酵 素 mRNA 表 現 之 影 響 的 確 認

於 HepG2 細 胞 添 加 被 驗 化 合 物 , 將 進 行 8 小 時 培 養 後 的 HMG-CoA 還 原 酵 素 mRNA 表 現 量 藉 由 定 量 實 時 PCR 法 進 行 測 定 。

即 , 將 HepG2 細 胞 於 24 孔 盤 以 2×10^5 cells/well 的 濃 度

進行播種並培養一晚後，加入對於培養液為1000分之1倍的溶解於二甲基亞砷（DMSO）的被驗化合物，或僅DMSO。將細胞在CO₂ 恆溫培養機於37℃進行8小時培養後，加入ISOGEN（Nippongene公司、目錄號碼31-02501）500μL，萃取total RNA。由萃取之total RNA使用High Capacity cDNA Reverse Transcription kit（Applied Biosystems公司、目錄號碼4368813）合成cDNA。人類HMG-CoA還原酵素mRNA表現量使用對於人類HMG-CoA還原酵素為專一性的以下引子組：5'-GGTGTTCAAGGAGCATGCAAAG-3'及5'-TGACAAGATGTCCTGCTGCCA-3'、以及Fast SYBR Green master mix（Applied Biosystems公司、目錄號碼4385614），藉由定量實時PCR法而測定。作為測定機器使用7900HT Fast Realtime PCR system。

將所得之HMG-CoA還原酵素mRNA表現量的測定值在被驗化合物添加取樣（對於各化合物各為3取樣）及對照組取樣（DMSO添加取樣：3取樣）之間，將β-Actin mRNA的表現量修正為指標。將修正後之被驗化合物添加取樣的HMG-CoA還原酵素mRNA表現量，以將對照組的HMG-CoA還原酵素mRNA表現量之平均值為1時之相對值（平均值±標準誤差）記載。

結果如表4所示。

且，作為被驗化合物使用以下者。

1：將trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶 -2-基

基) 胺基) 甲基 } -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲
基 } 環 己 基 } 乙 酸 (外 消 旋 體 化 合 物 (I))

外 消 旋 體 化 合 物 (I) 添 加 於 培 養 液 中 至 最 終 濃 度
10 μM 。

2 : trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三 氟 甲 基) 苯
基 } 乙 基 } { 5- [2- (甲 基 硫 代) 乙 氧 基 } 嘧 啶 -2-基 } 胺
基) 甲 基 } -4- (三 氟 甲 基) 苯 基 } (乙 基) 胺 基) 甲 基 }
環 己 基 } 乙 酸 (專 利 文 獻 2 實 施 例 44 所 記 載 之 化 合 物)

添 加 專 利 文 獻 2 實 施 例 44 所 記 載 之 化 合 物 於 培 養 液 中
至 最 終 濃 度 10 μM 。

[表 4]

被驗化合物	用量 (μM：培養液中之濃度)	HMG-CoA還原酵素mRNA表現量 (將對照組的平均值作為1時的相對值)
外消旋體化合物(I)	10	0.37±0.02
專利文獻2 實施例 44所記載之化合物	10	0.25±0.03

由 表 4 所 記 載 之 結 果 得 知 ， 與 對 照 組 之 比 較 中 ， 外 消
旋 體 化 合 物 (I) 、 及 專 利 文 獻 2 實 施 例 44 所 記 載 之 化 合
物 皆 可 顯 著 降 低 HMG-CoA 還 原 酵 素 mRNA 的 表 現 量 。

產 業 上 可 利 用 性

(S) 體 化 合 物 (III) 具 有 PCSK9 蛋 白 質 量 之 降 低 作
用 、 LDL 受 體 量 之 增 加 作 用 ， 且 因 顯 示 優 良 血 中 LDL 膽 固
醇 降 低 作 用 ， 例 如 可 利 用 作 為 降 低 血 中 LDL 膽 固 醇 的 醫 藥

之有效成分等，可利用於醫藥品產業上。

序列表

<110> Kowa Company Ltd.
 <120> 光學活性二苯甲胺衍生物及其製造方法
 <130> 111195M
 <150> JP 2010-128585
 <151> 2010-06-04
 <150> JP 2010-218299
 <151> 2010-09-29
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.1
 <210> 1
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工
 <400> 1
 ggtgttcaag gagcatgcaa ag
 <210> 2
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工
 <400> 2
 tgacaagatg tcctgctgcc a

七、申請專利範圍：

1. 一種化合物，或其鹽，其為實質上純粹光學性 (S) -trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸，或其鹽。

2. 一種化合物，或其鹽，其為實質上純粹光學性 trans- { 4- [({ 2- [({ 1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙基 } { 5- [2- (甲基磺醯基) 乙氧基] 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基] -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基] 環己基 } 乙酸的左旋性鏡像異構物，或其鹽。

3. 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項之化合物，或其鹽，其中光學純度為 99% ee 以上。

4. 一種醫藥，其特徵為將如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之化合物，或其鹽作為有效成分。

5. 如申請專利範圍第 4 項之醫藥，其為使用於選自高 LDL 血症、脂質異常症、動脈硬化症、粥狀性動脈硬化症、末梢血管疾病、高膽固醇血症、家族性高膽固醇血症、心臟血管障礙、狹心症、缺血症、心肌缺血症、血栓症、心肌梗塞、再灌流障礙、血管形成性再狹窄及高血壓的疾病之預防及 / 或治療者。

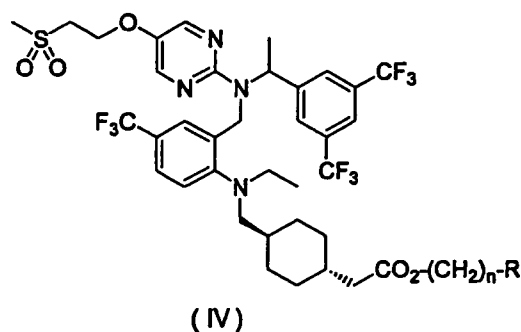
6. 一種 PCSK9 mRNA 表現抑制劑，其特徵為將如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之化合物，或其鹽作為有效成分。

7. 一種 PCSK9 蛋白質量之降低劑，其特徵為將如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之化合物，或其鹽作為有效成分。

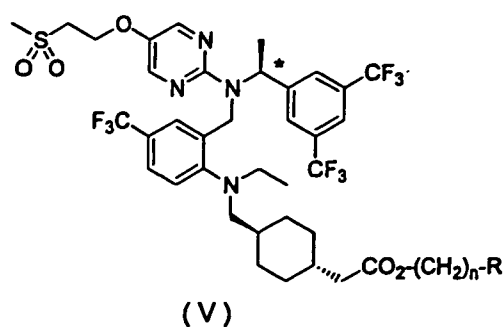
8. 一種 PCSK9 蛋白質產生抑制劑，其特徵為將如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之化合物，或其鹽作為有效成分。

9. 一種 LDL 受體量之增加劑，其特徵為將如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項之化合物，或其鹽作為有效成分。

10. 一種製造方法，其為實質上純粹光學性 (S) - trans- { 4- { ({ 2- { ({ 1- { 3,5-雙 (三氟甲基) 苯基 } 乙基 } { 5- { 2- (甲基磺醯基) 乙氧基 } 嘧啶 -2-基 } 胺基) 甲基 } -4- (三氟甲基) 苯基 } (乙基) 胺基) 甲基 } 環己基 } 乙酸，或其鹽之製造方法，其特徵為含有由下述一般式 (IV)：



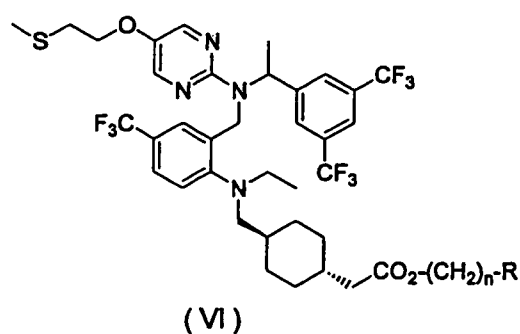
(式中，R 表示可具有取代基之 C₆₋₁₀ 芳基或可具有取代基之 5-10 員雜芳基，n 表示 1~6 之整數) 所示化合物的 (S) 體優勢對掌體在溶劑中優先晶析外消旋體優勢結晶並除去後，製造下述一般式 (V)：



(式中，R及n與前述同義)所示實質上純粹光學性化合物的步驟。

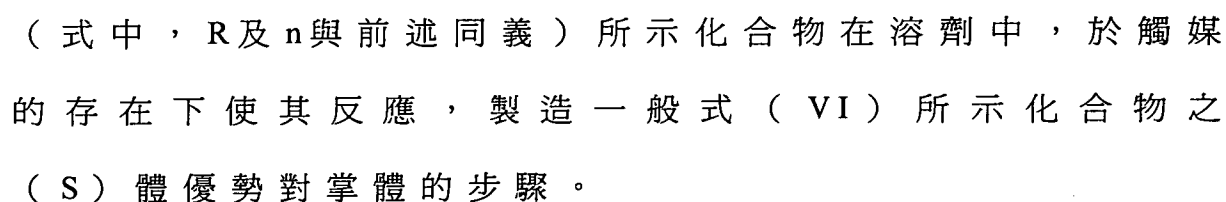
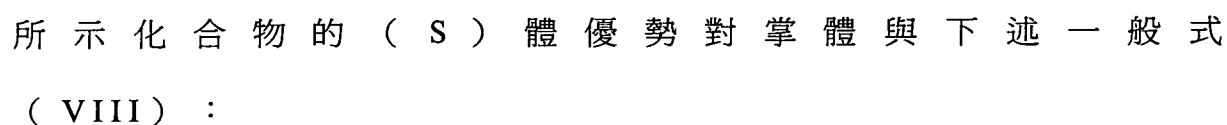
11. 如申請專利範圍第10項之方法，其中進一步含有由一般式(V)所示化合物除去-(CH₂)_n-R所示基的步驟。

12. 如申請專利範圍第10項或第11項之方法，其中進一步含有將下述一般式（VI）：



(式中，R及n與前述同義)所示化合物的(S)體優勢對掌體在溶劑中與氧化劑進行反應，製造一般式(IV)所示化合物的(S)體優勢對掌體(sumichiral)之步驟。

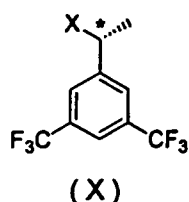
13. 如申請專利範圍第12項之方法，其中進一步含有將下述式（VII）：

CC1(C)C(C2=CC(=CC=C2C(F)(F)F)C(F)(F)F)N(C2=CC(=CC=C2C(F)(F)F)C(F)(F)F)C1CN(C)CC3CCCCC3C(=O)OR1

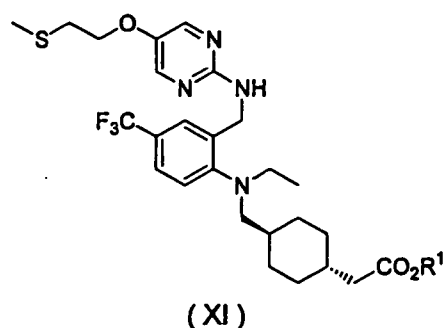
(IX)

(式中，R¹表示C₁₋₆烷基)所示化合物的(S)體優勢對掌體在溶劑中，於鹼之存在下進行水解，製造式(VII)所示化合物之(S)體優勢對掌體的步驟。

15. 如申請專利範圍第14項之方法，其中進一步含有將下述一般式（X）：



(式中，X 表示鹵素原子) 所示化合物與下述一般式 (XI)：



(式中， R^1 與前述同義) 所示化合物在溶劑中於鹼之存在下使其反應，製造一般式 (IX) 所示化合物之 (S) 體優勢對掌體的步驟。

16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中進一步含有將 (S) -1- [3,5-雙 (三氟甲基) 苯基] 乙醇在鹵化劑的存在下使其鹵化後製造一般式 (X) 所示化合物的步驟。

17. 一種如申請專利範圍第 10 項之一般式 (IV) 所示化合物，或其鹽。

18. 一種如申請專利範圍第 10 項之一般式 (V) 所示化合物，或其鹽。

19. 如申請專利範圍第 17 項或第 18 項之化合物，或其鹽，其中 R 為苯基，n 為 1。