

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7149980号

(P7149980)

(45)発行日 令和4年10月7日(2022.10.7)

(24)登録日 令和4年9月29日(2022.9.29)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 D 471/04 (2006.01)

C 0 7 D 471/04

1 1 8 Z

C 0 7 D 471/04

C S P

請求項の数 16 (全38頁)

(21)出願番号	特願2020-68663(P2020-68663)	(73)特許権者	503369495
(22)出願日	令和2年4月6日(2020.4.6)		帝人ファーマ株式会社
(62)分割の表示	特願2018-553004(P2018-553004)の分割		東京都千代田区霞が関三丁目2番1号
原出願日	平成29年11月27日(2017.11.27)	(74)代理人	100099759
(65)公開番号	特開2020-121989(P2020-121989 A)		弁理士 青木 篤
(43)公開日	令和2年8月13日(2020.8.13)	(74)代理人	100123582
審査請求日	令和2年11月27日(2020.11.27)		弁理士 三橋 真二
(31)優先権主張番号	特願2016-229973(P2016-229973)	(74)代理人	100141977
(32)優先日	平成28年11月28日(2016.11.28)		弁理士 中島 勝
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74)代理人	100117019
			弁理士 渡辺 陽一
		(74)代理人	100123593
			弁理士 関根 宣夫
		(72)発明者	宮本 英俊
			東京都千代田区霞が関三丁目2番1号
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ピリド [3, 4-d] ピリミジン誘導体又はその溶媒和物の結晶

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 6.3° 、 6.6° 、 11.6° 、 16.9° 及び 20.0° にピークを有する、1-(6-(6-(1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンの結晶。

【請求項2】

示差走査熱量分析における吸熱ピークの補外開始点温度が 277°C である、請求項1に記載の結晶。

【請求項3】

赤外吸収スペクトル(KBr法)において、波数 703 cm^{-1} 、 896 cm^{-1} 及び 3418 cm^{-1} に特徴的な吸収ピークを有する、請求項1に記載の結晶。

【請求項4】

固体NMRスペクトル(^{13}C)において、 136.0 ppm 、 111.2 ppm 、 105.1 ppm 、 101.8 ppm 、 52.7 ppm 、 49.6 ppm 、 42.9 ppm 、 23.8 ppm 、及び 18.5 ppm に特徴的なピークを有する、請求項1に記載の結晶。

【請求項5】

固体NMRスペクトル(^{15}N)において、 248.6 ppm 、 245.7 ppm 、 229.2 ppm 、 214.5 ppm 、 174.3 ppm 、 86.5 ppm 、 54.7 ppm 及び -12.4 ppm に特徴的なピークを有する、請求項1に記載の結晶。

【請求項 6】

粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 5.3^\circ$ 、 7.3° 、 10.3° 、 15.1° 及び 17.4° にピークを有する、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3,4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンの結晶。

【請求項 7】

示差走査熱量分析における吸熱ピークの補外開始点温度が 277°C である、請求項 6 に記載の結晶。

【請求項 8】

赤外吸収スペクトル (KBr 法) において、波数 874 cm^{-1} 、 1330 cm^{-1} 、及び 3314 cm^{-1} に特徴的な吸収ピークを有する、請求項 6 に記載の結晶。

10

【請求項 9】

固体 NMR スペクトル (^{13}C) において、 154.7 ppm 、 138.8 ppm 、 133.6 ppm 、 113.2 ppm 、 101.6 ppm 、 100.4 ppm 、 67.4 ppm 、 51.8 ppm 、 26.6 ppm 及び 23.3 ppm に特徴的なピークを有する、請求項 6 に記載の結晶。

【請求項 10】

固体 NMR スペクトル (^{15}N) において、 243.6 ppm 、 86.7 ppm 、 56.7 ppm 及び -12.4 ppm に特徴的なピークを有する、請求項 6 に記載の結晶。

【請求項 11】

20

粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 6.0^\circ$ 、 10.0° 、 13.7° 、 20.3° 及び 23.0° にピークを有する、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3,4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンの結晶。

【請求項 12】

示差走査熱量分析における吸熱ピークの補外開始点温度が 100°C 及び 278°C である、請求項 11 に記載の結晶。

【請求項 13】

赤外吸収スペクトル (KBr 法) において、波数 840 cm^{-1} 、 904 cm^{-1} 、 955 cm^{-1} 、 1490 cm^{-1} 、及び 3281 cm^{-1} に特徴的な吸収ピークを有する、請求項 11 に記載の結晶。

30

【請求項 14】

粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 5.2^\circ$ 、 7.2° 、 9.5° 、 14.5° 、 16.5° 、 20.9° 、 25.0° 及び 27.9° にピークを有する、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3,4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンの結晶。

【請求項 15】

示差走査熱量分析における吸熱ピークの補外開始点温度が 272°C である、請求項 14 に記載の結晶。

40

【請求項 16】

赤外吸収スペクトル (KBr 法) において、波数 1081 cm^{-1} 及び 1260 cm^{-1} に特徴的な吸収ピークを有する、請求項 14 に記載の結晶。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サイクリン依存性キナーゼ 4 及び／又はサイクリン依存性キナーゼ 6 (以下、「CDK4/6」ともいう。) に対する阻害活性を有し、例えば関節リウマチ、動脈硬化症、肺線維症、脳梗塞症及び／若しくは癌の予防又は治療に有用なピリド [3,4-d]ピリミジン誘導体又はその溶媒和物の結晶に関する。

50

【背景技術】

【0002】

C D K 4 / 6 阻害剤は、癌、心血管障害、腎臓病、特定の感染症及び自己免疫疾患を含む異常細胞増殖が原因である様々な疾患を治療するために用いることができる。例えば関節リウマチ、動脈硬化症、肺線維症、脳梗塞症、癌の治療に有効であることが期待される。このような症例において、C D K 阻害を介した細胞周期、細胞増殖抑制が有効であることは以下のような技術的知見に基づく。

【0003】

関節リウマチにおいては滑膜細胞の過増殖によるパンヌスの形成が知られており、C D K 4 / 6 阻害剤を動物に投与することによって、改善されることが報告されている（非特許文献1）。また、関節リウマチ患者由来滑膜細胞においてはC D K 4 - サイクリン D 複合体により、M M P 3 産生も制御されており、C D K 4 / 6 の活性を負に制御することにより、増殖だけではなく、M M P 3 産生が抑制されることも報告されている（非特許文献2）。

【0004】

以上の点より、C D K 4 / 6 阻害剤は、関節リウマチに対して滑膜細胞増殖抑制効果とともに軟骨保護効果も期待できる。

マウスの肺線維症のモデルにおいては、アデノウイルスベクターによる細胞周期阻害蛋白質 p 2 1 の発現誘導が有効であることが報告されている（非特許文献3）。

ラットの脳梗塞モデルにおいては、局所の虚血による神経細胞死に伴いサイクリン D 1 / C D K 4 レベルが向上することが知られており、非選択的 C D K 阻害剤であるフラボピリドールの投与により神経細胞死が抑制されることが報告されている（非特許文献4）。

【0005】

サイクリン D - C D K 4 / 6 - I N K 4 a - R b 経路は、癌の細胞増殖に有利となるようにいずれかの因子の異常、例えば機能的 p 1 6 I N K 4 a の欠失やサイクリン D 1 高発現、C D K 4 高発現、機能的 R b の欠失などがヒトの癌において高頻度に検出されている（非特許文献5）。これらは、いずれも G 1 期から S 期への進行を促進する方向への異常であり、この経路が癌化又は癌細胞の異常増殖において重要な役割を担っていることは明らかである。

【0006】

C D K 4 / 6 阻害剤は、特に C D K 4 / 6 キナーゼ活性を活性化する遺伝子に異常がある腫瘍、例えばサイクリン D の転座がある癌、サイクリン D の増幅がある癌、C D K 4 や C D K 6 の増幅又は過剰発現がある癌、p 1 6 不活性化がある癌に対して有効となり得る。また、その欠陥がサイクリン D の存在量の増加をもたらすサイクリン D の上流調節因子において遺伝子異常がある癌の治療に有用となり得、治療効果を期待することもできる。

実際、C D K 4 / 6 活性を阻害する化合物を合成する試みがなされ、当分野で多くの化合物が開示されており、乳癌をはじめとした複数の癌において臨床試験が実施されている（非特許文献6）。

【0007】

大部分の急性及び重篤な放射線療法や化学療法の毒性は、幹細胞及び前駆細胞への効果を通してである。C D K 4 / 6 阻害剤により休止状態になった造血幹細胞及び前駆細胞は、放射線療法や化学療法による細胞毒性から防護される。阻害剤処理が止まった後、造血幹細胞及び前駆細胞（H S P C）は、一時的休止期間から回復し、その後正常に機能するため、C D K 4 / 6 阻害剤を用いた化学療法抵抗性は、著しい骨髄防護を提供すると期待される（非特許文献7）。

【0008】

以上から、C D K 4 / 6 阻害剤は、例えば関節リウマチ、動脈硬化症、肺線維症、脳梗塞症、癌の治療、骨髄防護に有用であり、特に関節リウマチ、癌の治療、骨髄防護に有効であることが期待される。

C D K 4 / 6 を含む C D K 阻害剤としては特許文献1及び2が知られている。

10

20

30

40

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【文献】国際公開第2003/062236号

国際公開第2010/020675号

【非特許文献】

【0010】

【文献】Taniguchi, K等, Nature Medicine, 1999年, 第5巻, 760-767頁

Nonomura, Y 等, Arthritis & Rheumatology, 2006年7月, 第54巻, 第7号, 2074-83頁

Inoshima, I等, American Journal Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2004年, 第286巻, L727-L733頁

Osuga, H等, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000年, 第97巻, 10254-10259頁

Weinberg, R, Science, 1991年, 第254巻, 1138-1146頁

Guha, M, Nature Biotechnology, 2013年3月, 第31巻, 第3号, 187頁

Johnson, S等, Journal of Clinical Investigation, 2010年, 第120巻, 第7号, 2528-2536頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明の目的は、優れたCDK4/6阻害活性を有する新規のピリド[3,4-d]ピリミジン誘導体又はその溶媒和物の結晶を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0012】

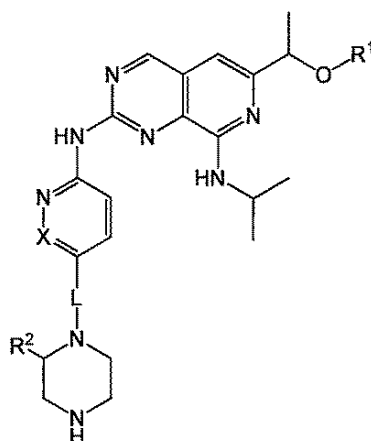
本発明者らは上記目的で鋭意研究した結果、特定構造のピリド[3,4-d]ピリミジン誘導体が、特に優れたCDK4/6阻害活性を有することを見出した。

さらに本発明者らは、それらの化合物の一部に、化学的に安定であり、かつ医薬原薬として適した構造の結晶が存在することを見出した。

【0013】

すなわち本発明は、式(I)で表される化合物又はその溶媒和物の結晶である。

【化1】



(I)

【0014】

式中、R¹は水素原子またはC₁-3アルキル基を表し、R²は水素原子またはオキシ基を表し（オキシ基の場合、R²は二重結合でピペラジン環に結合している。）、Lは単結合またはC₁-3アルキレン基を表し、XはCHまたはNを表す。

【発明の効果】

【0015】

本発明により、優れたCDK4／6阻害活性を有し、例えば関節リウマチ、動脈硬化症、肺線維症、脳梗塞症及び／若しくは癌の予防薬又は治療薬として有用なピリド[3, 4-d]ピリミジン誘導体又はその溶媒和物の結晶が提供される。

本発明の結晶は、医薬品製造用原体として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】図1は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのD晶の粉末X線回折スペクトルである。

10

【図2】図2は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのA晶の粉末X線回折スペクトルである。

【図3】図3は、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリダジル)ピペラジンのA晶の粉末X線回折スペクトルである。

【図4】図4は、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリダジル)ピペラジンのB晶の粉末X線回折スペクトルである。

20

【図5】図5は、(R)-N8-イソプロピル-6-(1-メトキシエチル)-N2-(5-(ピペラジン-1-イルメチル)ピリジン-2-イル)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2, 8-ジアミンのA晶の粉末X線回折スペクトルである。

【図6】図6は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのB晶の粉末X線回折スペクトルである。

【図7】図7は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのジメチルスルホキシド和物の結晶(C晶)の粉末X線回折スペクトルである。

30

【図8】図8は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのI晶の粉末X線回折スペクトルである。

【図9】図9は、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリダジル)ピペラジンのC晶の粉末X線回折スペクトルである。

【図10】図10は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのD晶の赤外吸収スペクトルである。

【図11】図11は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのA晶の赤外吸収スペクトルである。

40

【図12】図12は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのジメチルスルホキシド和物の結晶(C晶)の赤外吸収スペクトルである。

【図13】図13は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンのI晶の赤外吸収スペクトルである。

【図14】図14は、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イ

50

ソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリダジ
ル)ピペラジンのA晶の赤外吸収スペクトルである。

【図15】図15は、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イ
ソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリダジ
ル)ピペラジンのC晶の赤外吸収スペクトルである。

【図16】図16は、(R)-N8-イソプロピル-6-(1-メトキシエチル)-N2
-(5-(ピペラジン-1-イルメチル)ピリジン-2-イル)ピリド[3, 4-d]ピ
リミジン-2, 8-ジアミンのA晶の赤外吸収スペクトルである。

【図17-1】図17は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8
-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピ
リジル)ピペラジン-2-オンのD晶の固体NMRスペクトル(^{13}C)であり、図17
-1は6500Hzモード、図17-2は14000Hzモードを示す。

【図17-2】同上。

【図18】図18は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イ
ソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジ
ル)ピペラジン-2-オンのD晶の固体NMRスペクトル(^{15}N)である。

【図19-1】図19は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8
-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピ
リジル)ピペラジン-2-オンのA晶の固体NMRスペクトル(^{13}C)であり、図19
-1は6500Hzモード、図19-2は14000Hzモードを示す。

【図19-2】同上。

【図20】図20は、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イ
ソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジ
ル)ピペラジン-2-オンのA晶の固体NMRスペクトル(^{15}N)である。

【図21-1】図21は、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イ
ソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリ
ダジル)ピペラジンのA晶の固体NMRスペクトル(^{13}C)であり、図21-1は65
00Hzモード、図21-2は14000Hzモードを示す。

【図21-2】同上。

【図22】図22は、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イ
ソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリダジ
ル)ピペラジンのA晶の固体NMRスペクトル(^{15}N)である。

【図23-1】図23は、(R)-N8-イソプロピル-6-(1-メトキシエチル)-
N2-(5-(ピペラジン-1-イルメチル)ピリジン-2-イル)ピリド[3, 4-d]
]ピリミジン-2, 8-ジアミンのA晶の固体NMRスペクトル(^{13}C)であり、図2
3-1は6500Hzモード、図23-2は14000Hzモードを示す。

【図23-2】同上。

【図24】図24は、(R)-N8-イソプロピル-6-(1-メトキシエチル)-N2
-(5-(ピペラジン-1-イルメチル)ピリジン-2-イル)ピリド[3, 4-d]ピ
リミジン-2, 8-ジアミンのA晶の固体NMRスペクトル(^{15}N)である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の結晶は、粉末X線回折スペクトル(XRD)、示差走査熱量分析(DSC)、
フーリエ変換赤外吸収スペクトル(以下「赤外吸収スペクトル」という。)及び/又は固
体NMRスペクトル等によって特徴付けられる。これらの結晶の粉末X線回折(XRD)
スペクトルは特徴的なパターンを示し、それぞれの結晶は特異的な回折角 2θ の値を有す
る。これらの結晶は示差走査熱量分析(DSC)においても、それぞれに特徴的な熱挙動
を示す。これら結晶の赤外吸収スペクトルは、特徴的なパターンを示し、それぞれの結晶
は特異的な波数の赤外吸収スペクトルを示す。これら結晶の ^{13}C 固体NMRスペクトル
は特徴的なパターンを示し、それぞれの結晶は特異的な化学シフト(ppm)を有する。

10

20

30

40

50

また、これら結晶の ^{15}N 固体NMRスペクトルは特徴的なパターンを示し、それぞれの結晶は特異的な化学シフト (ppm) を有する。

【0018】

本発明は、前記式 (I) で表される化合物の結晶であるが、以下、その好適な実施形態として、次の3化合物の9結晶について記載する。

1- (6- ((6- ((1R) -1-ヒドロキシエチル) -8- (イソプロピルアミノ) ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル) アミノ) -3-ピリジル) ピペラジン-2-オン (以下、「化合物 (a)」と表すこともある。)

1- (6- ((6- ((1R) -1-メトキシエチル) -8- (イソプロピルアミノ) ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル) アミノ) -3-ピリダジル) ピペラジン- (以下、「化合物 (b)」と表すこともある。)

(R) -N8-イソプロピル-6- (1-メトキシエチル) -N2- (5- (ピペラジン-1-イルメチル) ピリジン-2-イル) ピリド [3, 4-d] ピリミジン-2, 8-ジアミン (以下、「化合物 (c)」と表すこともある。)

【0019】

化合物 (a) のD晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、 $2\theta = 6.3^\circ$ 、 6.6° 、 11.6° 、 16.9° 及び 20.0° に特徴的なピークを有する。また、化合物 (a) のD晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、図1に示すパターンを有する。

化合物 (a) のD晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 277°C の吸熱ピークを有する。

化合物 (a) のD晶は、KBr錠剤法による赤外吸収スペクトルにおいて、 703 cm^{-1} 、 896 cm^{-1} 及び 3418 cm^{-1} の波数で特徴的な吸収ピークを有する。また、化合物 (a) のD晶は、図10に示す赤外吸収スペクトルチャートを示す。

化合物 (a) のD晶は、 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、 136.0 ppm 、 111.2 ppm 、 105.1 ppm 、 101.8 ppm 、 52.7 ppm 、 49.6 ppm 、 42.9 ppm 、 23.8 ppm 、及び 18.5 ppm の化学シフトを有する。また、化合物 (a) のD晶は、図17-1 (6500 Hz) 及び図17-2 (14000 Hz) に示す ^{13}C 固体NMRスペクトルチャートを示す。

化合物 (a) のD晶は、 ^{15}N 固体NMRスペクトルにおいて 248.6 ppm 、 245.7 ppm 、 229.2 ppm 、 214.5 ppm 、 174.3 ppm 、 86.5 ppm 、 54.7 ppm 及び -12.4 ppm の化学シフトを有する。また、化合物 (a) のD晶は、図18に示す ^{15}N 固体NMRスペクトルチャートを示す。

【0020】

化合物 (a) のA晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 5.3^\circ$ 、 7.3° 、 10.3° 、 15.1° 及び 17.4° に特徴的なピークを有する。また、化合物 (a) のA晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、図2に示すパターンを有する。

化合物 (a) のA晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 277°C の吸熱ピークを有する。

化合物 (a) のA晶は、KBr錠剤法による赤外吸収スペクトルにおいて、 874 cm^{-1} 、 1330 cm^{-1} 、及び 3314 cm^{-1} の波数で吸収ピークを有する。また、化合物 (a) のA晶は、図11に示す赤外吸収スペクトルチャートを示す。

化合物 (a) のA晶は、 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、 154.7 ppm 、 138.8 ppm 、 133.6 ppm 、 113.2 ppm 、 101.6 ppm 、 100.4 ppm 、 67.4 ppm 、 51.8 ppm 、 26.6 ppm 及び 23.3 ppm の化学シフトを有する。また、化合物 (a) のA晶は、図19-1 (6500 Hz) 及び図19-2 (14000 Hz) に示す ^{13}C 固体NMRスペクトルチャートを示す。

化合物 (a) のA晶は、 ^{15}N 固体NMRスペクトルにおいて、 243.6 ppm 、 86.7 ppm 、 56.7 ppm 及び -12.4 ppm の化学シフトを有する。また、化合物 (a) のA晶は、図20に示す ^{15}N 固体NMRスペクトルチャートを示す。

【0021】

10

20

30

40

50

化合物 (a) の B 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 5.3^\circ$ 、 6.0° 、 6.7° 、 10.4° 及び 20.8° に特徴的なピークを有する。また、化合物 (a) の B 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、図 6 に示すパターンを有する。

化合物 (a) の B 晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 271°C の吸熱ピークを有する。

【0022】

化合物 (a) の C 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 6.0^\circ$ 、 10.0° 、 13.7° 、 20.3° 及び 23.0° に特徴的なピークを有する。また、化合物 (a) の C 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、図 7 に示すパターンを有する。

化合物 (a) の C 晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 100°C 及び 278°C の吸熱ピークを有する。

化合物 (a) の C 晶は、KBr 錠剤法による赤外吸収スペクトルにおいて、 840 cm^{-1} 、 904 cm^{-1} 、 955 cm^{-1} 、 1490 cm^{-1} 、及び 3281 cm^{-1} の波数で吸収ピークを有する。また、化合物 (a) の C 晶は、図 12 に示す赤外吸収スペクトルチャートを示す。

【0023】

化合物 (a) の I 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 5.2^\circ$ 、 7.2° 、 9.5° 、 14.5° 、 16.5° 、 20.9° 、 25.0° 及び 27.9° に特徴的なピークを有する。また、化合物 (a) の I 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、図 8 に示すパターンを有する。

化合物 (a) の I 晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 272°C の吸熱ピークを有する。

化合物 (a) の I 晶は、KBr 錠剤法による赤外吸収スペクトルにおいて、 1081 cm^{-1} 及び 1260 cm^{-1} の波数で吸収ピークを有する。また、化合物 (a) の I 晶は、図 13 に示す赤外吸収スペクトルチャートを示す。

【0024】

化合物 (b) の A 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 5.2^\circ$ 、 7.6° 、 8.4° 、 10.5° 、 15.2° 、 16.9° 、 20.1° 、 21.0° 、 23.3° 及び 26.6° に特徴的なピークを有する。また、化合物 (b) の A 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、図 3 に示すパターンを有する。

化合物 (b) の A 晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 225°C の吸熱ピークを有する。

化合物 (b) の A 晶は、赤外吸収スペクトルにおいて、 1369 cm^{-1} 、 1424 cm^{-1} 、 1508 cm^{-1} 、 1545 cm^{-1} 及び 1566 cm^{-1} の波数で吸収ピークを有する。また、化合物 (b) の A 晶は、図 14 に示す赤外吸収スペクトルチャートを示す。

化合物 (b) の A 晶は、 ^{13}C 固体 NMR スペクトルにおいて、 163.4 ppm 、 157.6 ppm 、 155.5 ppm 、 117.8 ppm 、 82.2 ppm 、 56.1 ppm 及び 42.3 ppm の化学シフトを有する。また、化合物 (b) の A 晶は、図 21-1 (6500 Hz) 及び図 21-2 (14000 Hz) に示す ^{13}C 固体 NMR スペクトルチャートを示す。

化合物 (b) の A 晶は、 ^{15}N 固体 NMR スペクトルにおいて、 311.7 ppm 、 232.4 ppm 、 168.5 ppm 、 79.5 ppm 、 53.3 ppm 、 32.9 ppm 及び -4.3 ppm の化学シフトを有する。また、化合物 (b) の A 晶は、図 22 に示す ^{15}N 固体 NMR スペクトルチャートを示す。

【0025】

化合物 (b) の B 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 5.2^\circ$ 、 6.6° 、 8.1° 、 15.2° 、 15.9° 、 16.2° 、 18.8° 、 20.5° 、 20.8° 及び 21.7° に特徴的なピークを有する。また、化合物 (b) の B 晶は、粉末 X 線回折スペクトルにおいて、図 4 に示すパターンを有する。

化合物 (b) の B 晶は、示差走査熱量分析 (DSC) において、補外開始点温度が 22

10

20

30

40

50

1℃の吸熱ピークを有する。

【0026】

化合物(b)のC晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、回折角 $2\theta = 5.2^\circ$ 、 7.6° 、 8.4° 、 10.0° 、 10.5° 、 11.9° 、 15.2° 、 17.0° 、 20.9° 及び 21.2° に特徴的なピークを有する。また、化合物(b)のC晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、図9に示すパターンを有する。

化合物(b)のC晶は、示差走査熱量分析(DSC)において、補外開始点温度が 223°C の吸熱ピークを有する。

【0027】

化合物(b)のC晶は、KBr錠剤法による赤外吸収スペクトルにおいて、 1369 cm^{-1} 、 1424 cm^{-1} 、 1507 cm^{-1} 、 1546 cm^{-1} 及び 1566 cm^{-1} の波数で吸収ピークを有する。また、化合物(b)のC晶は、図15に示す赤外吸収スペクトルチャートを示す。

【0028】

化合物(c)のA晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、 $2\theta = 4.8$ 、 7.6 、 8.2 、 9.7 、 15.3 、 16.6 、 19.1 、 19.8 、 22.4 及び 26.2° に特徴的なピークを有する。また、化合物(c)のA晶は、粉末X線回折スペクトルにおいて、図5に示すパターンを有する。

化合物(c)のA晶は、示差走査熱量分析(DSC)において、補外開始点温度が 182°C の吸熱ピークを有する。

【0029】

化合物(c)のA晶は、KBr錠剤法による赤外吸収スペクトルにおいて、 1115 cm^{-1} 、 1446 cm^{-1} 、 1508 cm^{-1} 、 1560 cm^{-1} 及び 1601 cm^{-1} の波数で吸収ピークを有する。また、化合物(c)のA晶は、図16に示す赤外吸収スペクトルチャートを示す。

化合物(c)のA晶は、 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、 161.3 ppm 、 150.8 ppm 、 138.9 ppm 、 128.1 ppm 、 109.8 ppm 、 82.7 ppm 、 47.6 ppm 、 42.5 ppm 、 41.5 ppm 、 24.5 ppm 、及び 21.7 ppm の化学シフトを有する。また、化合物(c)のA晶は、図23-1(6500 Hz)及び図23-2(14000 Hz)に示す ^{13}C 固体NMRスペクトルチャートを示す。

【0030】

化合物(c)のA晶は、 ^{15}N 固体NMRスペクトルにおいて、 242.8 ppm 、 233.8 ppm 、 219.0 ppm 、 171.7 ppm 、 86.9 ppm 、 54.9 ppm 、 11.3 ppm 及び -5.5 ppm の化学シフトを有する。また、化合物(c)のA晶は、図24に示す ^{15}N 固体NMRスペクトルチャートを示す。

【0031】

ここで「特徴的なピーク」とは各々の結晶多形の粉末X線回折スペクトルにおいて主に認められるピーク及び固有のピークを意味する。本発明の回折角で特定される結晶には、上記の特徴的なピーク以外のピークを認めるものも含まれる。

【0032】

粉末X線回折スペクトルにおける回折角 2θ の位置および相対強度は測定条件によって多少変動しうるものであるため、 2θ がわずかに異なる場合であっても、適宜スペクトル全体のパターンを参照して結晶形の同一性は認定されるべきであり、かかる誤差の範囲の結晶も本発明に含まれる。 2θ の誤差としては、例えば、 $\pm 0.5^\circ$ 、 $\pm 0.2^\circ$ が考えられる。すなわち、上記回折角で特定される結晶には、 $\pm 0.2^\circ$ から $\pm 0.5^\circ$ の範囲で一致するものも含まれる。

また、粉末X線回折スペクトルの測定条件(例えば、装置)に由来する誤差の範囲の結晶も本発明に含まれる。

【0033】

10

20

30

40

50

示差走査熱分析（DSC）において、ピークの補外開始点温度とは、発熱または吸熱ピークの開始点の温度であり、外挿により求めた発熱または吸熱開始温度をいう。示差走査熱分析（DSC）における発熱および吸熱ピークも測定条件によって多少変動しうる。誤差としては、例えば、 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ の範囲が考えられる。すなわち、上記ピークで特定される結晶は、 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ から $\pm 5^{\circ}\text{C}$ の範囲で一致するものも含まれる。

【0034】

一般に、固体NMRスペクトルにおける化学シフトも、誤差が生じ得るものである。かかる誤差としては、例えば、 $\pm 0.25\text{ ppm}$ 、典型的には、 $\pm 0.5\text{ ppm}$ の範囲である。すなわち、上記化学シフトで特定される結晶形は、 $\pm 0.25\text{ ppm}$ から $\pm 0.5\text{ ppm}$ の範囲で一致するものも含まれる。また、回転周波数や測定機器の相違により、ピーク強度が変化したり、ピークが出現又は消滅することがある。

10

【0035】

一般に、赤外吸収スペクトルにおける吸収ピークも、誤差が生じ得るものである。かかる誤差としては、例えば、 $\pm 2\text{ cm}^{-1}$ 、典型的には、 $\pm 5\text{ cm}^{-1}$ の範囲である。すなわち、上記波数で特定される結晶形は、 $\pm 2\text{ cm}^{-1}$ から $\pm 5\text{ cm}^{-1}$ の範囲で一致するものも含まれる。

【0036】

さらに、粉末X線回折スペクトル、示差走査熱分析（DSC）、赤外吸収スペクトル、 ^{13}C 固体NMRスペクトル及び ^{15}N 固体NMRスペクトルのいずれについても、結晶の標準品、例えば本願実施例記載の方法により得られた各結晶の実測値と、本願記載の数値との差も、測定誤差として許容されうる。すなわち、かかる方法により算出された誤差範囲内で、回折角、吸熱および発熱ピーク、赤外吸収スペクトルまたは ^{13}C 固体NMRスペクトルおよび ^{15}N 固体NMRスペクトルが一致する結晶も本発明の結晶に含まれる。

20

【実施例】

【0037】

以下、本開示に係る実施例を挙げて具体的に説明する。ただし、以下の実施例は本発明を限定するものではない。例えば、以下の実施例で例示する化合物の合成方法、精製方法及び結晶化方法は、本発明の結晶を得るための方法の例示であり、本発明の結晶が以下に開示する合成方法、精製方法及び結晶化方法によってのみ得られた結晶に限定されるものではない。

30

【0038】

実施例の結晶に係る化合物及び合成の際に単離された新規化合物の構造は、 $^1\text{H-NMR}$ 又はLC/MS（液体クロマトグラフ／質量分析計）を用いる質量分析法により確認した。

【0039】

$^1\text{H-NMR}$ については、JEOL JNM-ECZ400S（400MHz）を用いた。溶媒が CDCl_3 の場合はテトラメチルシラン（0.0ppm）を、 $\text{DMSO}-d_6$ の場合はジメチルスルホキシドのピーク（2.49ppm）を標準ピークとして用いた。 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル（400MHz、 $\text{DMSO}-d_6$ 、 CD_3OD 、または CDCl_3 ）については、その化学シフト（ δ ：ppm）およびカップリング定数（J：Hz）を示す。なお、以下の略号はそれぞれ次のものを表す。s=singlet、d=doublet、t=triplet、q=quartet、brs=broad singlet、m=multiplet。

40

【0040】

LC/MSの結果については、各化合物の $[\text{M}+\text{H}]^+$ の値（分子量実測値（Obs. MS）：すなわち化合物の分子質量[M]にプロトン $[\text{H}]^+$ が付加した実測値）を示す。

【0041】

実施例に係る結晶の粉末X線回折スペクトルは、以下の条件で測定した。

装置：ブルカー・エイエックスエス製 D8 DISCOVER With GADDS CS、線源： $\text{Cu}\cdot\text{K}\alpha$ 、波長： $1.541838(10^{-10}\text{m})$ 、管電圧－管電流

50

：40 kV－40 mA、入射側平板グラファイトモノクロメータ、コリメータ ϕ 300 μ m、2次元PSPC検出器、スキャン3～40°

【0042】

実施例に係る視差走査熱量は、以下の条件で測定した。

装置：パーキンエルマー製DSC8000、昇温速度：毎分10℃、雰囲気：窒素、サンプルパン：アルミニウム、サンプリング：0.1秒、測定温度範囲：25～300℃

【0043】

実施例に係る赤外吸収スペクトル（KBr法）は、日本薬局方の一般試験法に記載された赤外吸収スペクトル測定法の臭化カリウム錠剤法に従い、以下の条件で測定した。

装置：サーモフィッシャーサイエンティフィック製 AVATAR320 Nicolet iS5、測定範囲：4000～400 cm^{-1} 、分解能：4 cm^{-1} 、積算回数：16

【0044】

実施例に係る固体NMRスペクトルは、以下の条件で測定した。

装置：ブルカー製 DSX300WB、測定核：13C及び15N、パルス繰り返し時間：5秒、パルスモード：CP/MAS測定

【0045】

【実施例1】

本実施例では、1－（6－（（6－（（1R）－1－ヒドロキシエチル）－8－（イソプロピルアミノ）ピリド[3，4－d]ピリミジン－2－イル）アミノ）－3－ピリジル）ピペラジン－2－オン（化合物（a））のD晶について説明する。

まず、化合物（a）の合成方法について説明する。

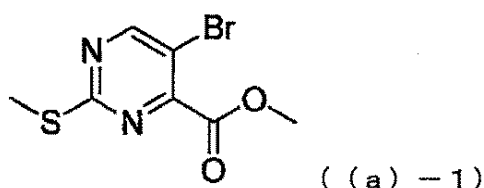
【0046】

<化合物（a）－1の合成>

以下の化合物（a）－1で示されるメチル 5－ブロモ－2－メチルチオピリミジン－4－カルボキシレートの合成を行った。

【0047】

【化2】



【0048】

5－ブロモ－2－（メチルチオ）ピリミジン－4－カルボン酸（110 g、0.44 mol）のメタノール溶液（1.1 L）を攪拌しながら0℃に冷却し、塩化チオニル（50 mL、0.66 mol）を滴下した。反応溶液をゆっくりと加熱し、加熱還流下で4時間反応させた。反応の完結をLC/MSとTLCで確認し、反応溶液を室温で冷却した。揮発成分を減圧下で留去し、残渣を酢酸エチル（1 L）に溶解させ、10%炭酸ナトリウム水溶液（200 mL）で3回、飽和食塩水（200 mL）で2回洗浄し、得られた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、固体を濾別した後、濾液を減圧下で濃縮した。得られた粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題化合物（88 g、75%）を得た。

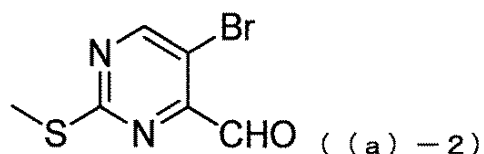
【0049】

<化合物（a）－2の合成>

以下の化合物（a）－2で示される5－ブロモ－2－メチルチオピリミジン－4－カルバルデヒドの合成を行った。

【0050】

【化3】



10

【0051】

化合物 (a) - 1 (25 g、95 mmol) の THF (テトラヒドロフラン) 溶液 (375 mL) を窒素雰囲気下で -78°C に冷却し、撹拌した。この溶液に水素化ジイソブチルアルミニウム (84 mL、143 mmol、1.7 M トルエン溶液) を滴下し、 -78°C で4時間撹拌し、反応の完結を TLC で確認後、 -78°C でメタノールを滴下して反応を停止させ、反応溶液をゆっくりと 0°C まで昇温させた。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、セライトを通して吸引濾過した。濾液を飽和食塩水 (200 mL) で2回洗浄し、得られた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、固体を濾別した。濾液を濃縮することで、表題化合物 (25 g、粗体) を得た。この粗体は更に精製することなく次の反応に用いた。

20

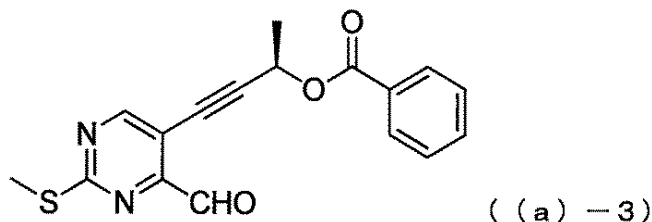
【0052】

<化合物 (a) - 3 の合成>

以下の化合物 (a) - 3 で示される (R) - 3 - (4-ホルミル-2-メチルチオピリミジン-5-イル) - 1-メチル-2-プロピニル ベンゾエートの合成を行った。

【0053】

【化4】



30

【0054】

$\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$ (7.832 g、11.2 mmol)、ヨウ化銅 (2.12 g、11.2 mmol) との 1, 4-ジオキサン溶液 (60 mL) を脱気およびアルゴン置換し、ジイソプロピルエチルアミン (25.29 mL、145.1 mmol) を室温で添加した。この反応溶液を室温で5分間撹拌し、化合物 (a) - 2 と (5-ブロモ-2-メチルチオピリミジン-4-イル) メトキシメタノールの混合物 (26.0 g、粗体) の 1, 4-ジオキサン溶液 (50 mL) を室温にて添加した後、(R) - 1-メチル-2-プロピニルベンゾエート (23.3 g、133.9 mmol) の 1, 4-ジオキサン溶液 (55 mL) をゆっくりと滴下し、反応溶液を室温で16時間撹拌した。反応の進行を LC/MS で追跡し、反応が完結したら、反応混合物を酢酸エチル (400 mL) で希釈し、セライトを通して吸引濾過し、セライトを酢酸エチルで洗浄した。得られた濾液を減圧下で濃縮し、得られた粗体をそのまま次の反応に使用した。

40

なお、化合物 (a) - 2 と (5-ブロモ-2-メチルチオピリミジン-4-イル) メトキシメタノールの混合物の合成については、参考例 1 に記載する。

【0055】

50

(参考例 1)

化合物 (a) - 2 と (5-ブロモ-2-メチルチオピリミジン-4-イル) メトキシメタノールの混合物の合成

【0056】

【化5】



10

【0057】

化合物 (a) - 2 (25 g、95 mmol) の THF 溶液 (375 mL) を窒素雰囲気下で -78℃ に冷却し、攪拌した。この溶液にジイソブチルアルミニウムヒドリド (84 mL、143 mmol、1.7 M トルエン溶液) を滴下し、-78℃ で 4 時間攪拌し、反応の完結を TLC で確認後、-78℃ でメタノールを滴下して反応を停止させ、反応溶液をゆっくりと 0℃ まで昇温させた。反応溶液を酢酸エチルで希釈し、セライトを通して吸引濾過した。濾液を飽和食塩水 (200 mL) で 2 回洗浄し、得られた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、固体を濾別した。濾液を濃縮することで、表題化合物の混合物 (25 g、粗体) を得た。この粗体は更に精製することなく次の反応に用いた。

20

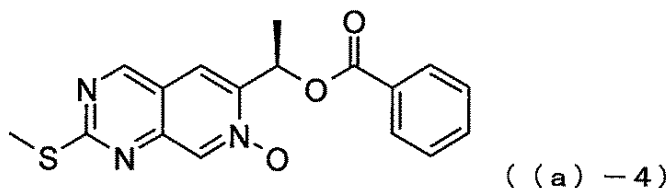
【0058】

<化合物 (a) - 4 の合成>

以下の化合物 (a) - 4 で示される (R) - 6 - (1-(ベンゾイルオキシ)エチル)-2-(メチルチオ)ピリド [3, 4-d] ピリミジン-7-オキシドの合成を行った。

【0059】

【化6】



30

【0060】

化合物 (a) - 3 (26.0 g、79.8 mmol) のエタノール溶液 (260 mL) にヒドロキシアミン・塩酸塩 (8.31 g、119.6 mmol) および酢酸ナトリウム (9.81 g、119.6 mmol) を室温にて加え、室温にて 16 時間攪拌した。この反応溶液にエタノール (250 mL) を追加し、さらに室温にて炭酸カリウム (27.5 g、199.4 mmol) を室温にて加えた後、50℃ で 3 時間攪拌した。反応の進行を LC/MS で追跡し、反応が完結したら、反応混合物をセライトを通して吸引濾過し、セライトを酢酸エチル (1.0 L) および少量のメタノールで洗浄した。得られた濾液を減圧下で濃縮し、得られた有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、固体を濾別した。得られた粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題の化合物 (a) - 4 (13.0 g、48%) を得た。

40

【0061】

化合物 (a) - 4 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは次の通りであった。

50

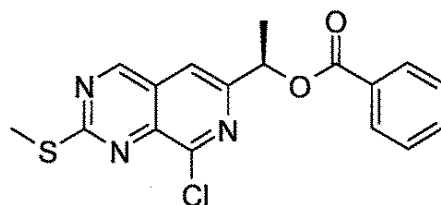
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 9.04 (1H, s), 8.79 (1H, s), 8.14 (2H, d, $J=7.5\text{ Hz}$), 7.77–7.40 (4H, m), 6.66 (1H, q, $J=6.3\text{ Hz}$), 2.65 (3H, s), 1.79 (3H, d, $J=6.6\text{ Hz}$)
【0062】

<化合物 (a) - 5 の合成>

以下の化合物 (a) - 5 で示される (R) - 1 - (8 - クロロ - 2 - (メチルチオ) ピリド [3, 4 - d] ピリミジン - 6 - イル) エチル ベンゾエートの合成を行った。

【0063】

【化7】



((a) - 5)

【0064】

化合物 (a) - 4 (8.0 g、23.5 mmol) のジクロロメタン溶液 (130 mL) に塩化チオニル (51 mL、704 mmol) を窒素雰囲気下で 0℃ にて滴下し、反応溶液を室温にて 16 時間攪拌した。反応の進行を TLC (薄層クロマトグラフィー) で追跡し、反応が完結したら反応溶液を減圧下で濃縮し、得られた有機相をアルミナカラムクロマトグラフィーで精製し、化合物 (a) - 5 (3.2 g、37%) を得た。

【0065】

化合物 (a) - 5 の $^1\text{H-NMR}$ の結果は次の通りであった。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 9.19 (1H, s), 8.16–8.12 (2H, m), 7.68 (1H, s), 7.64–7.58 (1H, m), 7.53–7.46 (2H, m), 6.27 (1H, q, $J=6.8\text{ Hz}$), 2.74 (3H, s), 1.81 (3H, d, $J=6.4\text{ Hz}$)

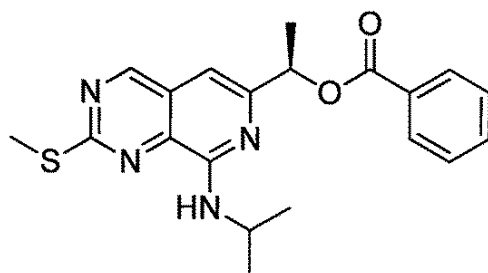
【0066】

<化合物 (a) - 6>

以下の化合物 (a) - 6 で示される (R) - 1 - (8 - (イソプロピルアミノ) - 2 - (メチルチオ) ピリド [3, 4 - d] ピリミジン - 6 - イル) エチル ベンゾエートの合成

【0067】

【化8】



((a) - 6)

【0068】

化合物 (a) - 5 (3.06 g、8.5 mmol) とイソプロピルアミン (18 mL)

の混合物を 80℃で 1 時間攪拌した後、反応溶液を室温まで冷却した。反応溶液を水で希釈し、酢酸エチルで抽出した。得られた有機相を食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を留去して得られた粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することで、表題の化合物 (a) - 6 (1.78 g、収率 55%) を得た。

【0069】

得られた化合物 (a) - 6 の $^1\text{H-NMR}$ の結果は次の通りであった。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 9.28 (1H, s), 8.08 (2H, d, $J=7.4\text{ Hz}$), 7.70 (1H, t, $J=7.4\text{ Hz}$), 7.57 (2H, t, $J=7.7\text{ Hz}$), 7.05 (1H, d, $J=8.0\text{ Hz}$), 6.99 (1H, s), 5.34 (2H, s), 4.32 (1H, m), 2.66 (3H, s), 1.25 (6H, d, $J=6.5\text{ Hz}$)

10

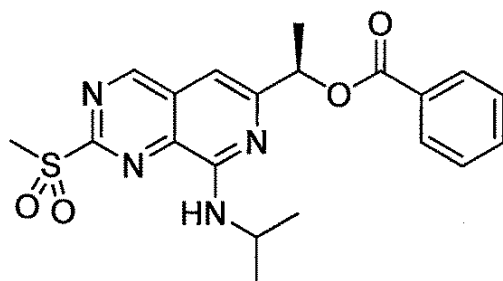
【0070】

<化合物 (a) - 7 の合成>

以下の化合物 (a) - 7 で示される (R) - 1 - (8 - (イソプロピルアミノ) - 2 - (メチルスルホニル) ピリド [3, 4-d] ピリミジン-6-イル) エチル ベンゾエートの合成を行った。

【0071】

【化9】



((a) - 7)

20

【0072】

化合物 (a) - 6 (1.78 g、4.7 mmol) のテトラヒドロフラン (47 ml) と水 (47 ml) の混合溶液に 0℃でオキソン (ペルオキシ硫酸カリウム) (5.72 g、9.3 mmol) を加え、室温にて 18 時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで抽出し、得られた有機相を水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を留去して得られた粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することで、表題の化合物 (a) - 7 (1.61 g、収率 87%) を得た。

LC/MS: (M+H) $^+$ = 415.0

【0073】

<化合物 (a) - 8 の合成>

以下の化合物 (a) - 8 で示される tert-ブチル 4 - (6 - ニトロピリジン-3-イル) - 3 - オキソピペラジン-1 - カルボキシレートの合成を行った。

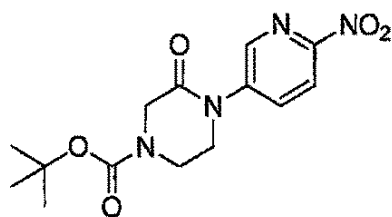
【0074】

30

40

50

【化10】



((a) -8)

10

【0075】

2-ニトロ-5-ブロモピリジン (1.01 g、5.0 mmol)、tert-ブチル 2-オキソ-4-ピペラジン-カルボキシレート (1.00 g、5.0 mmol) と炭酸セシウム (3.26 g、10.0 mmol) を 1,4-ジオキサンに懸濁させ、30分間窒素ガスをバブリングさせた。この懸濁液に、Xantphos (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) (246 mg、0.43 mmol) と トリス(ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム (229 mg、0.25 mmol) を添加し、加熱還流下で2時間攪拌した。反応溶液を室温で冷却した後、水と酢酸エチルを加え、セライトを通してろ過した。濾液の有機相を分離し、水相を酢酸エチルで抽出した。得られた有機相を混合し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させたのち、固体を濾別し、減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、表題の化合物 (a) -8 (1.08 g、67%) を得た。

20

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.67 (1H, d, $J=2.4\text{ Hz}$), 8.32 (1H, d, $J=8.8\text{ Hz}$), 8.15 (1H, dd, $J=8.8, 2.4\text{ Hz}$), 4.33 (2H, s), 3.93-3.83 (4H, m), 1.51 (9H, s)

【0076】

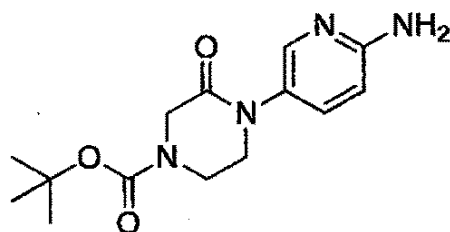
<化合物 (a) -9 の合成>

以下の化合物 (a) -9 で示される tert-ブチル 4-(6-アミノピリジン-3-イル)-3-オキソピペラジン-1-カルボキシレートの合成を行った。

30

【0077】

【化11】



((a) -9)

40

【0078】

化合物 (a) -8 (1.08 g、3.34 mmol) をエタノール (45 mL) と THF (22 mL) に溶解させた。この溶液にパラジウム炭素 (108 mg) を加え、水素雰囲気下で24時間攪拌した。反応溶液をセライトを通して濾過し、濾液を減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して表題の化合物 (a) -9 (0.928 g、95%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.99 (1H, d, $J=2.4\text{ Hz}$), 7.38 (1H, dd, $J=8.8, 2.4\text{ Hz}$), 6.53 (1H, d, $J=8.8\text{ Hz}$), 4.5

50

0 (2H, brs), 4.24 (2H, s), 3.78 (2H, t, J=5.1 Hz), 3.67 (2H, t, J=5.4 Hz), 1.50 (9H, s)

【0079】

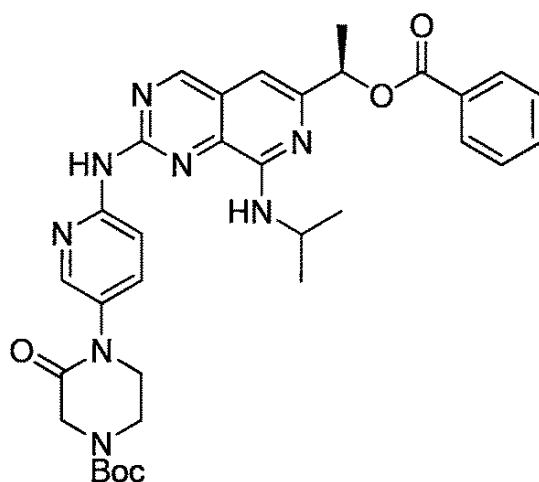
<化合物(a)-10の合成>

以下の化合物(a)-10で示されるtert-ブチル(R)-4-(6-(1-(ベンゾイロキシ)エチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3,4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)ピリジン-3-イル)-3-オキソピペラジン-1-カルボキシレートの合成を行った。

【0080】

【化12】

10



20

((a)-10)

【0081】

化合物(a)-7 (62mg、0.15mmol)と化合物(a)-9 (88mg、0.30mmol)をトルエン(0.375ml)中で6日間、100℃にて攪拌した。反応溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して表題化合物(0.0092g、10%)を得た。

30

¹H-NMR (DMSO) δ: 10.27 (1H, s), 9.27 (1H, s), 8.33 (2H, m), 8.07 (2H, m), 7.86 (1H, m), 7.70 (1H, m), 7.58 (3H, m), 7.00 (1H, s), 6.55 (1H, d), 5.98 (1H, q), 4.27 (1H, m), 4.11 (2H, s), 3.74 (4H, m), 1.68 (3H, d), 1.45 (9H, s), 1.30 (6H, m)

【0082】

<化合物(a)の合成及び精製>

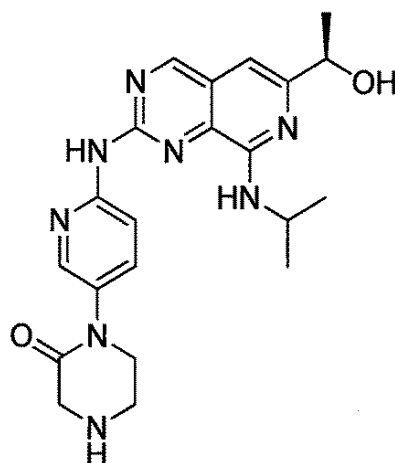
化合物(a)で示される1-(6-(6-(1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3,4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オンの合成を行った。

40

【0083】

50

【化 13】



(a)

【0084】

化合物 (a) - 10 (9.2 mg、0.15 mmol) のジクロロメタン溶液 (0.35 ml) にとりフルオロ酢酸 (0.15 ml) を室温にて加え、1時間攪拌した。反応溶液を濃縮乾固した後、テトラヒドロフラン (0.15 ml) とメタノール (0.15 ml) を加え、4 M 水酸化リチウム水溶液 (0.018 ml) 加えた。反応溶液をギ酸にて中和した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製して表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ : 10.16 (1H, s), 9.26 (1H, s), 8.31 (1H, m), 8.29 (1H, s), 7.81 (1H, m), 7.00 (1H, s), 6.42 (1H, m), 5.18 (1H, d), 4.63 (1H, m), 4.27 (1H, m), 3.65 (2H, m), 3.41 (2H, s), 3.05 (2H, m), 1.39 (3H, d), 1.30 (6H, m)

【0085】

<化合物 (a) の D 晶の製造>

前述のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製された化合物 (a) の溶液を濃縮して飽和化し、結晶を析出させた。これにより、化合物 (a) の D 晶を得た。

【0086】

<化合物 (a) の D 晶の評価>

得られた結晶の XRD を図 1 に示す。回折角 $2\theta = 6.3^\circ$ 、 6.6° 、 11.6° 、 16.9° 及び 20.0° にピークが観測された。

示差走査熱量分析 (DSC) における吸熱ピークは 277°C であった。

得られた結晶の赤外吸収スペクトル (KBr 法) を図 10 に示す。波数 703 cm^{-1} 、 896 cm^{-1} 及び 3418 cm^{-1} にピークが観測された。

【0087】

得られた結晶の固体 NMR スペクトル (^{13}C) を図 17-1 (6500 Hz) 及び図 17-2 (14000 Hz) に示す。化学シフト 136.0 ppm 、 111.2 ppm 、 105.1 ppm 、 101.8 ppm 、 52.7 ppm 、 49.6 ppm 、 42.9 ppm 、 23.8 ppm 及び 18.5 ppm にピークが観測された。

得られた結晶の固体 NMR スペクトル (^{15}N) を図 18 に示す。化学シフト 248.6 ppm 、 245.7 ppm 、 229.2 ppm 、 214.5 ppm 、 174.3 ppm 、 86.5 ppm 、 54.7 ppm 及び -12.4 ppm にピークが観測された。

【0088】

[実施例 2]

本実施例では、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソ

プロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オン(化合物(a))のA晶について説明する。

【0089】

<化合物(a)のA晶の製造>

化合物(a)のA晶は、実施例1で得られた化合物(a)のD晶を変換させて製造した。具体的には、D晶をD晶の5~50倍量のエタノールに懸濁させた後、反応溶液を6時間加熱攪拌し、次いで反応溶液を0℃で攪拌した後、析出物を濾取、乾燥して結晶を得た。

なお、溶媒量、加熱時間、攪拌条件、濾別までの時間は特に限定されないが、それらの条件が結晶の収率、化学純度、粒子径、粒度分布などに影響することがあるので、目的に応じて組み合わせて設定することが好ましい。濾取は通常の方法、例えば自然濾過、加圧濾過、減圧濾過、加熱乾燥、減圧加熱乾燥を用いることができる。

【0090】

<化合物(a)のA晶の評価>

得られた結晶のXRDを図2に示す。回折角 $2\theta = 5.3^\circ$ 、 7.3° 、 10.3° 、 15.1° 及び 17.4° にピークが観測された。

示差走査熱量分析(DSC)における吸熱ピークは 277°C であった。

得られた結晶の赤外吸収スペクトル(KBr法)を図11に示す。 874 cm^{-1} 、 1330 cm^{-1} 、及び 3314 cm^{-1} にピークが観測された。

得られた結晶の固体NMRスペクトル(^{13}C)を図19-1(6500 Hz)及び図19-2(14000 Hz)に示す。化学シフト 154.7 ppm 、 138.8 ppm 、 133.6 ppm 、 113.2 ppm 、 101.6 ppm 、 100.4 ppm 、 67.4 ppm 、 51.8 ppm 、 26.6 ppm 及び 23.3 ppm にピークが観測された。

得られた結晶の固体NMRスペクトル(^{15}N)を図20に示す。化学シフト 243.6 ppm 、 86.7 ppm 、 56.7 ppm 及び -12.4 ppm にピークが観測された。

【0091】

[実施例3]

本実施例では、1-(6-((6-((1R)-1-ヒドロキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3, 4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリジル)ピペラジン-2-オン(化合物(a))のB晶について説明する。

【0092】

<化合物(a)のB晶の製造>

実施例1におけるカラムクロマトグラフィーで使用した溶媒をジクロロメタン/メタノール=20/1に変えて精製された化合物(a)の溶液を濃縮して飽和化し、結晶を析出させた。これにより化合物(a)のB晶を得た。

【0093】

<化合物(a)のB晶の評価>

得られた結晶のXRDを図6に示す。回折角 $2\theta = 5.3^\circ$ 、 6.0° 、 6.7° 、 10.4° 及び 20.8° にピークが観測された。

示差走査熱量分析(DSC)における吸熱ピークは 271°C であった。

【0094】

[実施例4]

<化合物(a)のC晶の製造>

化合物(a)のD晶(900mg)にジメチルスルホキシド(5.4mL)を加え、 70°C に加熱した。得られた溶液を 40°C に冷却した後、アセトニトリル(6.75mL)を加え 15°C に冷却し、2時間攪拌した。得られた固体を濾過し、アセトニトリル(2.5mL)で洗浄した後、 40°C で減圧乾燥し、ジメチルスルホキシド和物である表題化合物(986mg、92%)を得た。

【0095】

<化合物(a)のC晶の評価>

得られた結晶のXRDを図7に示す。回折角 $2\theta = 6.0^\circ$ 、 10.0° 、 13.7°

10

20

30

40

50

、 20.3° 及び 23.0° にピークが観測された。

示差走査熱量分析における吸熱ピークの補外開始点温度が 100°C 及び 278°C であった。

得られた結晶の赤外吸収スペクトル (KBr 法) を図 12 に示す。波数 840 cm^{-1} 、 904 cm^{-1} 、 955 cm^{-1} 、 1490 cm^{-1} 、及び 3281 cm^{-1} にピークが観測された。

【0096】

[実施例 5]

<化合物 (a) の I 晶の製造>

化合物 (a) の A 晶 (500 mg) に水 (10 mL) を加え、室温で 4 日間攪拌した。得られた固体を濾過し、 30°C で減圧乾燥し、表題化合物 (432 mg 、 86%) を得た。

【0097】

<化合物 (a) の I 晶の評価>

得られた結晶の XRD を図 8 に示す。回折角 $2\theta = 5.2^{\circ}$ 、 7.2° 、 9.5° 、 14.5° 、 16.5° 、 20.9° 、 25.0° 及び 27.9° にピークが観測された。

示差走査熱量分析 (DSC) における吸熱ピークは 272°C であった。

得られた結晶の赤外吸収スペクトル (KBr 法) を図 13 に示す。波数 1081 cm^{-1} 及び 1260 cm^{-1} にピークが観測された。

【0098】

[実施例 6]

本実施例では、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3,4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリダジル)ピペラジン(化合物 (b)) の A 晶について説明する。

まず、化合物 (b) の合成方法について説明する。

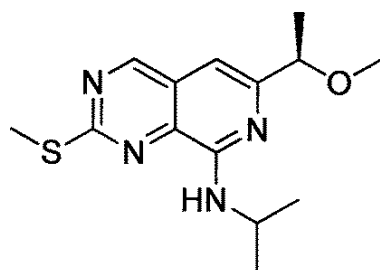
【0099】

<化合物 (b) - 1 の合成>

以下の化合物 (b) - 1 で示される (R)-N-イソプロピル-6-(1-メトキシエチル)-2-(メチルチオ)ピリド[3,4-d]ピリミジン-8-アミンの合成を行った。

【0100】

【化 14】



((b) - 1)

【0101】

化合物 (b) - 1 は、前述した化合物 (a) - 3、化合物 (a) - 4、化合物 (a) - 5 及び化合物 (a) - 6 と同様の手順によって合成した。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 9.27 (7H, s), 6.94 (1H, brs), 6.92 (1H, s), $4.30-4.23$ (1H, m), 3.29 (3H, s), 2.66 (3H, s), 1.38 (3H, d, $J = 6.4\text{ Hz}$), $1.32-1.25$ (6H, m)

【0102】

10

20

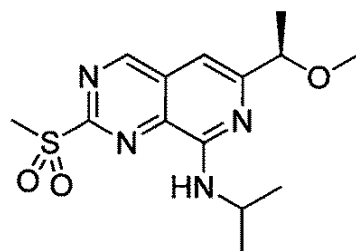
30

40

50

<化合物 (b) - 2 の合成>

以下の化合物 (b) - 2 で示される (R) - N - イソプロピル - 6 - (1 - メトキシエチル) - 2 - (メチルスルホニル) ピリド [3, 4 - d] ピリミジン - 8 - アミンの合成
【0103】
【化15】



((b) - 2)

10

【0104】

化合物 (b) - 1 のテトラヒドロフラン (THF) と水の混合溶液に 0℃ でオキシソンを加え、室温にて 18 時間攪拌した。反応溶液を酢酸エチルで抽出し、得られた有機相を水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を留去して得られた粗体をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することで、表題の化合物 (b) - 2 を得た。

20

LC / MS : (M + H)⁺ = 325.10

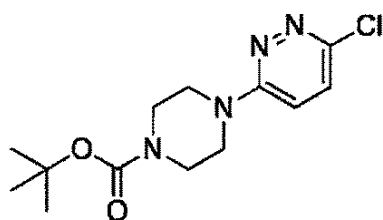
【0105】

<化合物 (b) - 3 の合成>

以下の化合物 (b) - 3 で示される tert - ブチル 4 - (6 - クロロピリダジン - 3 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキシレート の合成を行った。

【0106】

【化16】



((b) - 3)

30

【0107】

3, 6 - ジクロロピリダジン (5.01 g, 33.6 mmol) と tert - ブチル ピペラジン - 1 - カルボキシレート (6.88 g, 37.0 mmol) を DMF (50 mL) に溶解させ、トリエチルアミン (11.7 mL, 50.4 mmol) を添加して、80℃ で終夜攪拌した。反応溶液を室温に冷却し、水を加えた後、ジクロロメタンとメタノールの 95 : 5 混合溶液 (50 mL) で 3 回抽出した。混合した有機相を無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、固体を濾別した後、濾液を減圧下で濃縮した。得られた粗体をジエチルエーテルで洗浄することで、表題の化合物 (b) - 3 (7.0 g, 70%) を得た。

40

【0108】

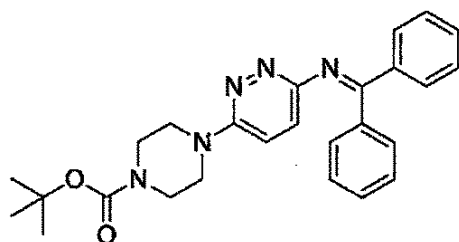
<化合物 (b) - 4 の合成>

以下の化合物 (b) - 4 で示される tert - ブチル 4 - (6 - ((ジフェニルメチレン) アミノ) ピリダジン - 3 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキシレート の合成を実施した。

50

【0109】

【化17】



((b) - 4)

10

【0110】

化合物 (b) - 3 (59.8 mg、0.20 mmol)、ベンゾフェノンイミン (43.5 mg、0.24 mmol)、トリス (ジベンジリデンアセトン) ジパラジウム (9.2 mg、0.010 mmol)、BINAP (2, 2'-ビス (ジフェニルホスフィノ) - 1, 1'-ビナフチル) (12.5 mg、0.020 mmol) と炭酸セシウム (130.3 mg、0.40 mmol) をトルエン (1.0 mL) に懸濁させ、100℃で終夜撹拌した。室温で冷却した後、反応溶液をセライトを通して濾過し、セライトを酢酸エチルで洗浄した。得られた濾液を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた後、

20

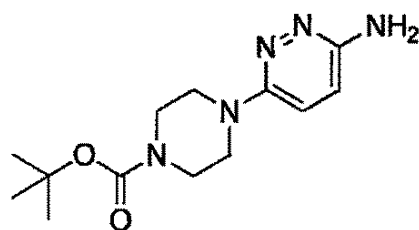
【0111】

<化合物 (b) - 5 の合成>

以下の化合物 (b) - 5 で示される tert-ブチル 4- (6-アミノピリダジン-3-イル) ピペラジン-1-カルボキシレート の合成を行った。

【0112】

【化18】



((b) - 5)

30

【0113】

化合物 (b) - 4 (67 mg、0.151 mmol) を THF (0.76 mL) に溶解させ、クエン酸水溶液 (0.378 mL、0.755 mmol、2 mol/L) を加えて室温で終夜撹拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (5 mL) を加えて中和し、酢酸エチル (5 mL) で2回抽出した。有機相を混合し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させ、固体を濾別した後、濾液を減圧下で濃縮した。得られた粗体を tert-ブチルメチルエーテル (5 mL) で洗浄することで、表題の化合物 (b) - 5 (0.30 g、71%) を得た。

40

その他、本実施例に関連する化合物として、6-アミノピリジン-3-カルバルデヒドと、tert-ブチル 4- [(6-アミノピリジン-3-イル) メチル] ピペラジン-1-カルボキシレート の合成方法を参考例として以下に示す。

【0114】

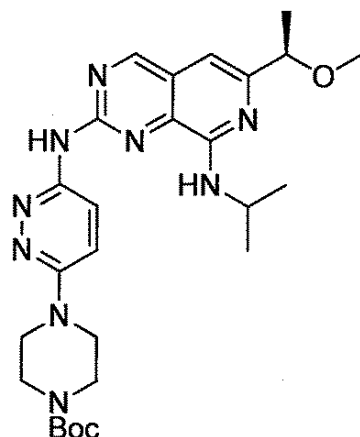
50

<化合物 (b) - 6 の合成>

化合物 (b) - 6 で示される *tert*-ブチル (R) - 4 - (6 - ((8 - (イソプロピルアミノ) - 6 - (1 - メトキシエチル) ピリド [3, 4 - d] ピリミジン - 2 - イル) アミノ) ピリダジン - 3 - イル) ピペラジン - 1 - カルボキシレート の合成を行った。

【0115】

【化19】



((b) - 6)

【0116】

実施例 1 で合成した化合物 (a) - 5 (708 mg、2.2 mmol) と化合物 (b) - 5 (732 mg、2.6 mmol) のトルエン溶液 (5.5 ml) を 100℃ にて 3 日間攪拌した。室温に戻した後、酢酸エチル (20 ml) とジクロロメタン (100 ml) で希釈し、飽和食塩水 (90 ml) および飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (10 ml) で洗浄した後、分離した有機相を濃縮乾固し、シリカゲルカラムにて精製し、表題の化合物 (b) - 6 (510 mg、45%) を得た。

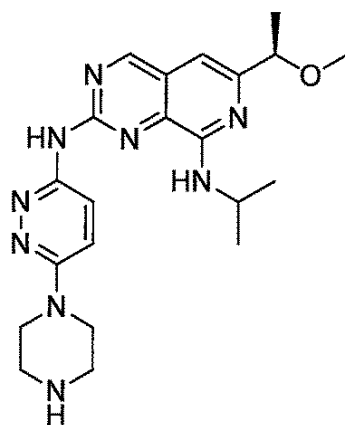
【0117】

<化合物 (b) の合成>

以下の化合物 (b) で表される 1 - (6 - ((6 - ((1R) - 1 - メトキシエチル) - 8 - (イソプロピルアミノ) ピリド [3, 4 - d] ピリミジン - 2 - イル) アミノ) - 3 - ピリダジル) ピペラジンの合成を行った。

【0118】

【化20】



(b)

10

20

30

40

50

【0119】

化合物 (b) - 6 (33.2 mg、0.063 mmol) のジクロロメタン溶液 (0.44 ml) に室温でトリフルオロ酢酸 (0.2 ml) を加え、室温にて1時間撹拌した。得られた溶液を濃縮乾固し、さらにHPLCを用いて分取精製し、表題化合物 (23.8 mg、88%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO) δ : 10.24 (1H, s), 9.20 (1H, s), 8.16 (1H, d), 7.36 (1H, d), 6.86 (1H, s), 6.35 (1H, d), 6.42 (1H, m), 4.22 (2H, m), 3.43 (4H, m), 3.26 (4H, m), 2.81 (3H, m), 1.37 (3H, d), 1.26 (6H, m)

【0120】

<化合物 (b) のA晶の製造>

HPLCによって分取精製された化合物 (b) のTFA塩 (トリフルオロ酢酸塩) を得た。次に得られたTFA塩を、水-ジクロロメタン中で撹拌した。次に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で水相をpH 8~9の弱アルカリ性に調整し、有機相を分離した。その後、飽和食塩水で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥させて溶媒を留去し、結晶を得た。

【0121】

<化合物 (b) のA晶の評価>

得られた結晶のXRDを図3に示す。回折角 $2\theta = 5.2^\circ$ 、 7.6° 、 8.4° 、 10.5° 、 15.2° 、 16.9° 、 20.1° 、 21.0° 、 23.3° 及び 26.6° にピークが観測された。

示差走査熱量分析 (DSC) における吸熱ピークは 225°C であった。

得られた結晶の赤外吸収スペクトル (KBr法) を図14に示す。波数 1369 cm^{-1} 、 1424 cm^{-1} 、 1508 cm^{-1} 、 1545 cm^{-1} 及び 1566 cm^{-1} にピークが観測された。

得られた結晶の固体NMRスペクトル (^{13}C) を図21-1 (6500 Hz) 及び図21-2 (14000 Hz) に示す。化学シフト 163.4 ppm 、 157.6 ppm 、 155.5 ppm 、 117.8 ppm 、 82.2 ppm 、 56.1 ppm 及び 42.3 ppm ピークが観測された。

得られた結晶の固体NMRスペクトル (^{15}N) を図22に示す。化学シフト 311.7 ppm 、 232.4 ppm 、 168.5 ppm 、 79.5 ppm 、 53.3 ppm 、 32.9 ppm 及び -4.3 ppm にピークが観測された。

【0122】

[実施例7]

本実施例では、1-(6-((6-((1R)-1-メトキシエチル)-8-(イソプロピルアミノ)ピリド[3,4-d]ピリミジン-2-イル)アミノ)-3-ピリダジル)ピペラジン (化合物 (b)) のB晶について説明する。

【0123】

<化合物 (b) のB晶の製造>

本実施例は、A晶の製造の過程で析出したTFA塩に、テトラヒドロフラン (0.15 ml) とメタノール (0.15 ml) 加え、4M水酸化リチウム水溶液 (0.018 ml) 加えた。反応溶液をギ酸にて中和した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製した。これにより得られた化合物 (b) の溶液を濃縮して飽和化し、結晶を析出させた。これにより、化合物 (b) のB晶を得た。

【0124】

<化合物 (b) のB晶の評価>

得られた結晶のXRDを図4に示す。回折角 $2\theta = 5.2^\circ$ 、 6.6° 、 8.1° 、 15.2° 、 15.9° 、 16.2° 、 18.8° 、 20.5° 、 20.8° 及び 21.7° にピークが観測された。

示差走査熱量分析 (DSC) における吸熱ピークは、 221°C であった。

【0125】

〔実施例 8〕

＜化合物（b）の C 晶の製造＞

化合物（b）の C 晶（1.1 g）にエタノール（11 mL）を加え、室温で終夜攪拌した。得られた固体を濾過し、40℃で減圧乾燥し、表題化合物（945 mg、86%）を得た。

【0126】

＜化合物（b）の C 晶の評価＞

得られた結晶の XRD を図 9 に示す。回折角 $2\theta = 5.2^\circ$ 、 7.6° 、 8.4° 、 10.0° 、 10.5° 、 11.9° 、 15.2° 、 17.0° 、 20.9° 及び 21.2° にピークが観測された。

示差走査熱量分析（DSC）における吸熱ピークは 223°C であった。

得られた結晶の赤外吸収スペクトル（KBr 法）を図 15 に示す。波数 1369 cm^{-1} 、 1424 cm^{-1} 、 1507 cm^{-1} 、 1546 cm^{-1} 及び 1566 cm^{-1} にピークが観測された。

【0127】

〔実施例 9〕

本実施例では、（R）-N8-イソプロピル-6-（1-メトキシエチル）-N2-（5-（ピペラジン-1-イルメチル）ピリジン-2-イル）ピリド[3,4-d]ピリミジン-2,8-ジアミン（化合物（c））の A 晶について説明する。

まず、化合物（c）の合成方法について説明する。

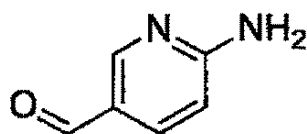
【0128】

＜化合物（c）-1 の合成＞

以下の化合物（c）-1 に示される 6-アミノピリジン-3-カルバルデヒドの合成の合成を行った。

【0129】

【化 21】



((c)-1)

【0130】

6-アミノピリジン-3-カルボニトリル（1.9 g、16 mmol）を THF（160 mL）に溶解させ、攪拌しながら -78°C に冷却した。この溶液に -78°C で水素化ジイソブチルアルミニウム（106.5 mL、1.5 M トルエン溶液）をゆっくりと滴下し、攪拌しながら 20°C まで昇温した後、2 時間攪拌を継続した。反応溶液に氷水（100 mL）を加えて反応を停止させ、ジクロロメタン（50 mL）で 3 回抽出した。得られた有機相を混合した後、食塩水（100 mL）で 1 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体を濾別した後、濾液を減圧下で濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで粗精製し、表題化合物の粗体（1.7 g）を得た。この粗体はこれ以上精製せずに次の反応に用いた。

【0131】

＜化合物（c）-2 の合成＞

以下の化合物（c）-2 に示される tert-ブチル 4-[(6-アミノピリジン-3-イル)メチル]ピペラジン-1-カルボキシレート の合成を行った。

【0132】

10

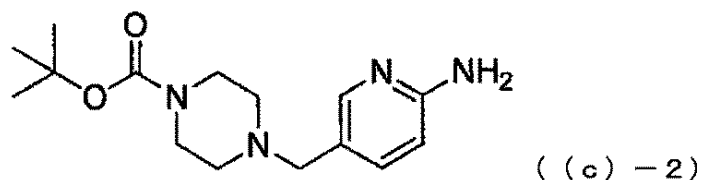
20

30

40

50

【化 2 2】



【0133】

6-アミノピリジン-3-カルボニトリル (1.9 g、16 mmol) を THF (160 mL) に溶解させ、攪拌しながら -78℃ に冷却した。この溶液に -78℃ で水素化ジイソブチルアルミニウム (106.5 mL、1.5 M トルエン溶液) をゆっくりと滴下し、攪拌しながら 20℃ まで昇温した後、2 時間攪拌を継続した。反応溶液に氷水 (100 mL) を加えて反応を停止させ、ジクロロメタン (50 mL) で 3 回抽出した。得られた有機相を混合した後、食塩水 (100 mL) で 1 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体を濾別した後、濾液を減圧下で濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで粗精製し、表題化合物の粗体 (1.7 g) を得た。

【0134】

次いで、得られた粗体 (1.7 g、13.9 mmol) と tert-ブチル ピペラジン-1-カルボキシレート (3.2 g、17.2 mmol) をジクロロメタン (50 mL) に溶解させ、室温で 8 時間攪拌した。この反応溶液にトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (8.84 g、40.9 mmol) を添加し、室温で 2 時間攪拌した。反応の進行は LC/MS で追跡し、反応終了後、飽和炭酸ナトリウム水溶液 (50 mL) を加えて反応を停止させ、酢酸エチル (50 mL) で 3 回抽出した。得られた有機相を混合し、食塩水 (100 mL) で 1 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。固体を濾別した後、濾液を減圧下で濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで粗精製し、表題化合物 (3.3 g、81%) を得た。

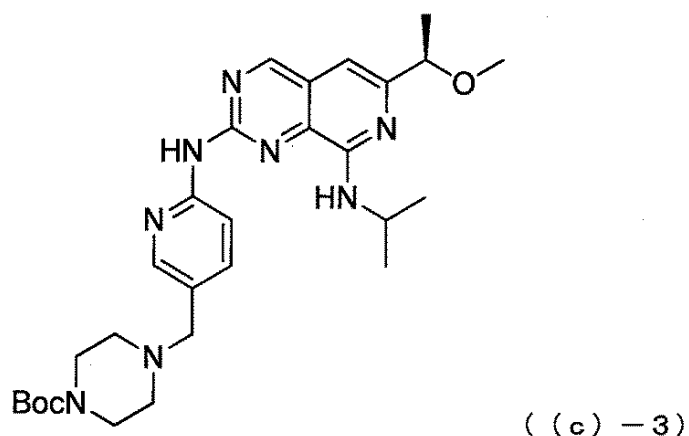
【0135】

<化合物 (c) - 3 の合成>

以下の化合物 (c) - 3 で示される、tert-ブチル (R) - 4 - ((6 - ((8 - (イソプロピルアミノ) - 6 - (1-メトキシエチル) ピリド [3, 4-d] ピリミジン-2-イル) アミノ) ピリジン-3-イル) メチル) ピペラジン-1-カルボキシレートの合成を行った。

【0136】

【化 2 3】



【0137】

実施例 2 で合成した化合物 (b) - 2 と化合物 (c) - 2 を化合物 (b) - 6 と同様の
方法で合成し、表題の化合物 (c) - 3 の合成を行った。

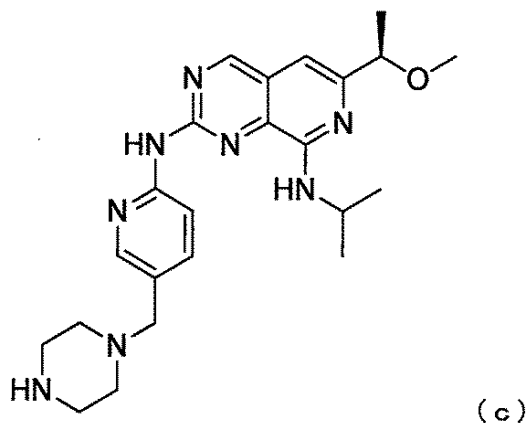
【0138】

<化合物 (c) の合成>

以下の化合物 (c) で示される (R) - N 8 - イソプロピル - 6 - (1 - メトキシエチル) - N 2 - (5 - (ピペラジン - 1 - イルメチル) ピリジン - 2 - イル) ピリド [3, 4 - d] ピリミジン - 2, 8 - ジアミンの合成

【0139】

【化 2 4】



【0140】

化合物 (c) - 3 を用いて実施例 1 の化合物 (a) と同様にして表題化合物を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 9.04 (1H, s), 8.34 (1H, d), 8.26 (1H, s), 7.74 (1H, dd), 6.84 (1H, s), 6.14 (1H, d), 4.41 (1H, m), 4.33 (1H, q), 3.49 (2H, s), 3.41 (3H, s), 2.91 (4H, m), 2.46 (4H, br), 1.50 (3H, d), 1.36 (6H, m)

【0141】

<化合物 (c) の A 晶の製造>

HPLCによって分取精製された化合物(c)の溶液を濃縮して飽和化し、結晶を析出させた。これにより、化合物(c)のA晶を得た。

【0142】

<化合物(c)のA晶の評価>

得られた結晶のXRDを図5に示す。回折角 $2\theta = 4.8^\circ$ 、 7.6° 、 8.2° 、 9.7° 、 15.3° 、 16.6° 、 19.1° 、 19.8° 、 22.4° 及び 26.2° にピークが観測された。

示差走査熱量分析(DSC)における吸熱ピークは、 182°C であった。

得られた結晶の赤外吸収スペクトル(KBr法)を図16に示す。波数 1115 cm^{-1} 、 1446 cm^{-1} 、 1508 cm^{-1} 、 1560 cm^{-1} 及び 1601 cm^{-1} にピークが観測された。

10

得られた結晶の固体NMRスペクトル(^{13}C)を図23-1(6500 Hz)及び図23-2(14000 Hz)に示す。化学シフト 161.3 ppm 、 150.8 ppm 、 138.9 ppm 、 128.1 ppm 、 109.8 ppm 、 82.7 ppm 、 47.6 ppm 、 42.5 ppm 、 41.5 ppm 、 24.5 ppm 、及び 21.7 ppm にピークが観測された。

得られた結晶の固体NMRスペクトル(^{15}N)を図24に示す。化学シフト 242.8 ppm 、 233.8 ppm 、 219.0 ppm 、 171.7 ppm 、 86.9 ppm 、 54.9 ppm 、 11.3 ppm 及び -5.5 ppm にピークが観測された。

20

【0143】

[実施例10] ヒトCDK4／サイクリン D3阻害活性評価

化合物(a)、化合物(b)および化合物(c)について、ヒトCDK4／サイクリン D3阻害活性の評価を行った。

評価は、カルナバイオサイエンス株式会社から購入したアッセイキット(QS S Assist CDK4／Cyclin D3 __FPキット)を用いて、化合物のCDK4／サイクリン D3阻害活性を測定した。本アッセイキットはモレキュラーデバイス社のIMAPテクノロジーに基づき、キナーゼによってリン酸化された蛍光基質がIMAP結合試薬に結合することで引き起こされる蛍光偏光の変化を定量することにより、キナーゼ活性を測定するものである。

【0144】

30

キット添付の $10\times$ アッセイバッファー又はキット添付と同組成の自家調製アッセイバッファーを各溶液調製に用いた。キット添付の $10\times$ アッセイバッファーを精製水で10倍希釈してアッセイバッファーを調製した。アッセイバッファーは、 20 mM HEPES ($\text{pH } 7.4$)、 0.01% Tween 20及び 2 mM ジチオトレイトールからなる。試験化合物溶液は、試験化合物をジメチルスルホキシド(DMSO)で終濃度の100倍に調製したのちに、アッセイバッファーで25倍希釈して終濃度の4倍に調製した。ATP／基質／Metal溶液は、キット添付の $5\times$ ATP／基質／Metal溶液をアッセイバッファーで5倍希釈して調製した。酵素溶液は、キット添付のCDK4／サイクリン D3を終濃度の2倍になるようアッセイバッファーで希釈して調製した(CDK4／サイクリン D3終濃度は、 $12.5\sim 25\text{ ng/ウェル}$)。検出試薬は、 $5\times$ IMAP結合バッファーA及び $5\times$ IMAP結合バッファーBを各々精製水で5倍希釈したのち、IMAP結合バッファーA：IMAP結合バッファーB=85：15となるよう混合し、ここにIMAP結合試薬を400倍希釈になるよう添加して調製した。

40

【0145】

384 ウェルプレートに試験化合物溶液を $5\text{ }\mu\text{L}$ 、ATP／基質／Metal溶液を $5\text{ }\mu\text{L}$ 添加し、さらに酵素溶液又はアッセイバッファー $10\text{ }\mu\text{L}$ を添加後、混合して酵素反応を開始した。総反応液量は $20\text{ }\mu\text{L/ウェル}$ であり、反応液組成は 20 mM HEPES ($\text{pH } 7.4$)、 0.01% Tween 20、 2 mM ジチオトレイトール、 100 nM FITC標識ペプチド基質(カルナバイオサイエンス)、 $100\text{ }\mu\text{M}$ ATP、 1 mM 塩化マグネシウム、 1% DMSO、 $12.5\sim 25\text{ ng/ウェル}$ CDK4／サイクリン D

50

3とした。室温にて45分間反応させたのちに、各ウェルに検出試薬を60 μ L添加し、室温・遮光条件にてさらに30分間反応させた。次いで、マイクロプレートリーダーを使用し、励起波長：485 nm、測定波長：535 nmでの蛍光偏光を測定した。

【0146】

酵素溶液を添加し、試験化合物溶液の代わりにDMSOを添加したときの酵素活性を100%、酵素溶液の代わりにアッセイバッファーを添加し、試験化合物溶液の代わりにDMSOを添加したときの酵素活性を0%として試験化合物の酵素活性阻害率を計算し、用量反応曲線にフィットさせてCDK4/サイクリン D3に対する50%阻害濃度を計算した。

その結果、各化合物のCDK4/サイクリン D3活性に対する阻害活性は、いずれもIC₅₀値<10 nMであった。

【0147】

【実施例11】 ヒトCDK2/サイクリン A2阻害活性の評価

化合物(a)、化合物(b)および化合物(c)について、ヒトCDK2/サイクリン A2阻害活性の評価を行った。カルナバイオサイエンス株式会社から購入したアッセイキット(QS S A s s i s t C D K 2 / C y c l i n A 2 _ F Pキット)を用いて、化合物のCDK2/サイクリン A2阻害活性を測定した。本アッセイキットはモレキュラーデバイス社のIMAPテクノロジーに基づき、キナーゼによってリン酸化された蛍光基質がIMAP結合試薬に結合することで引き起こされる蛍光偏光の変化を定量することにより、キナーゼ活性を測定するものである。

【0148】

キット添付の10×アッセイバッファーを精製水で10倍希釈してアッセイバッファーを調製し、各溶液調製に用いた。アッセイバッファーは、20 mM HEPES (pH 7.4)、0.01% Tween 20及び2 mM ジチオトレイトールからなる。試験化合物溶液は、試験化合物をジメチルスルホキシド(DMSO)で終濃度の100倍に調製したのち、アッセイバッファーで25倍希釈して終濃度の4倍に調製した。ATP/基質/Metal溶液は、キット添付の5×ATP/基質/Metal溶液をアッセイバッファーで5倍希釈して調製した。酵素溶液は、キット添付のCDK2/サイクリン A2を終濃度の2倍になるようアッセイバッファーで希釈して調製した(CDK2/サイクリン A2終濃度は、2.5 ng/ウェル)。検出試薬は、5×IMAP結合バッファーAを精製水で5倍希釈したものに、IMAP結合試薬を400倍希釈になるよう添加して調製した。

【0149】

384ウェルプレートに試験化合物溶液を5 μ L、ATP/基質/Metal溶液を5 μ L添加し、さらに酵素溶液又はアッセイバッファー10 μ Lを添加し、混合して酵素反応を開始した。総反応液量は20 μ L/ウェルであり、反応液組成は20 mM HEPES (pH 7.4)、0.01% Tween 20、2 mM ジチオトレイトール、100 nM FITC標識ペプチド基質(カルナバイオサイエンス)、30 μ M ATP、5 mM 塩化マグネシウム、1% DMSO、2.5 ng/ウェル CDK2/サイクリン A2とした。室温にて60分間反応させたのちに、各ウェルに検出試薬を60 μ L添加し、室温・遮光条件にてさらに30分間反応させた。次いで、マイクロプレートリーダーを使用し、励起波長：485 nm、測定波長：535 nmでの蛍光偏光を測定した。

【0150】

酵素溶液を添加し、試験化合物溶液の代わりにDMSOを添加したときの酵素活性を100%、酵素溶液の代わりにアッセイバッファーを添加し、試験化合物溶液の代わりにDMSOを添加したときの酵素活性を0%として試験化合物の酵素活性阻害率を計算し、用量反応曲線にフィットさせてCDK2/サイクリン A2に対する50%阻害濃度を計算した。

その結果、各化合物のCDK2/サイクリン A2活性に対する阻害活性は、100 nM $\leq$ IC₅₀値であった。

【0151】

10

20

30

40

50

【実施例 12】ヒトCDK6／サイクリン D3阻害活性の評価

CDK6／サイクリン D3阻害活性の測定は、Off-chip Mobility Shift Assay (MSA) 法により行った。MSA法は、タンパク質の分子量や電荷の違いによって電気泳動時の移動度が異なることを利用して、分離する方法である。キナーゼ活性測定においては、キナーゼによりリン酸化された基質電荷の陰性への変化を電気泳動の原理で分離してリン酸化の程度を定量することにより、キナーゼ活性を測定するものである。

【0152】

20mM HEPES (pH7.5)、0.01% Triton X-100、2mM ジチオトレイトールからなるアッセイバッファーを各溶液調製に用いた。試験化合物溶液は、試験化合物をジメチルスルホキシド (DMSO) で終濃度の100倍に調製したのち、アッセイバッファーで25倍希釈して終濃度の4倍に調製した。ATP／基質／Metal溶液は、終濃度の4倍のものを調製した。酵素溶液は、終濃度の2倍のものを調製した。酵素濃度は、酵素活性によるシグナルと陽性対照化合物の阻害活性値をもとに、適切な終濃度を設定した。

【0153】

384ウェルプレートに試験化合物溶液を5μL、ATP／基質／Metal溶液を5μL添加し、さらに酵素溶液又はアッセイバッファー10μLを添加、混合して酵素反応を開始した。総反応液量は20μL／ウェルであり、反応液組成は20mM HEPES (pH7.5)、0.01% Triton X-100、2mM ジチオトレイトール、1000nM ペプチド基質 (DYRKtide-F)、300μM ATP、5mM 塩化マグネシウム、1% DMSO、設定した濃度のCDK6／サイクリン D3とした。室温にて5時間反応させたのち、各ウェルにターミネーションバッファー (Quick Scout Screening Assist MSA; カルナバイオサイエンス社製) を60μL添加し、反応を停止させた。次いで、キャリパーライフサイエンス社のLabChip 3000を使用し、反応溶液中の基質ペプチドとリン酸化ペプチドを分離、定量した。キナーゼ反応は基質ペプチドピーク高さ (S) とリン酸化ペプチドピーク高さ (P) から計算される生成物比 (P / (P + S)) にて評価した。

【0154】

酵素溶液を添加し、試験化合物溶液の代わりにDMSOを添加したときの酵素活性を100%、酵素溶液の代わりにアッセイバッファーを添加し、試験化合物溶液の代わりにDMSOを添加したときの酵素活性を0%として、試験化合物の酵素活性阻害率を計算し、用量反応曲線にフィットさせてCDK6／サイクリン D3に対する50%阻害濃度を計算した。

その結果、各化合物のCDK6／サイクリン D3活性に対する阻害活性は、IC₅₀値<10nMであった。

【産業上の利用可能性】

【0155】

本発明の化合物 (I) の結晶は、医薬品製造用原体として用いることができる。

10

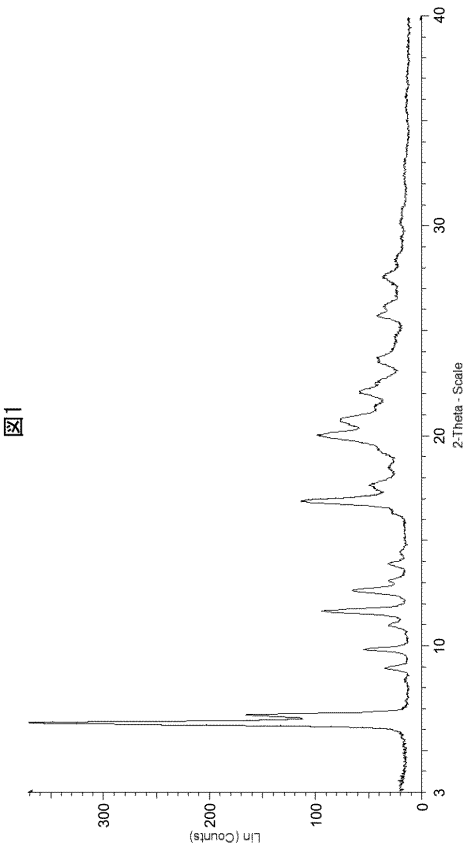
20

30

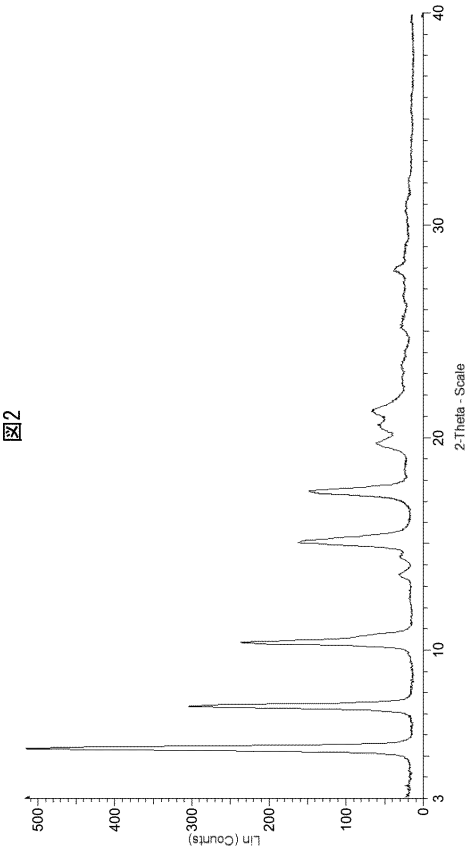
40

50

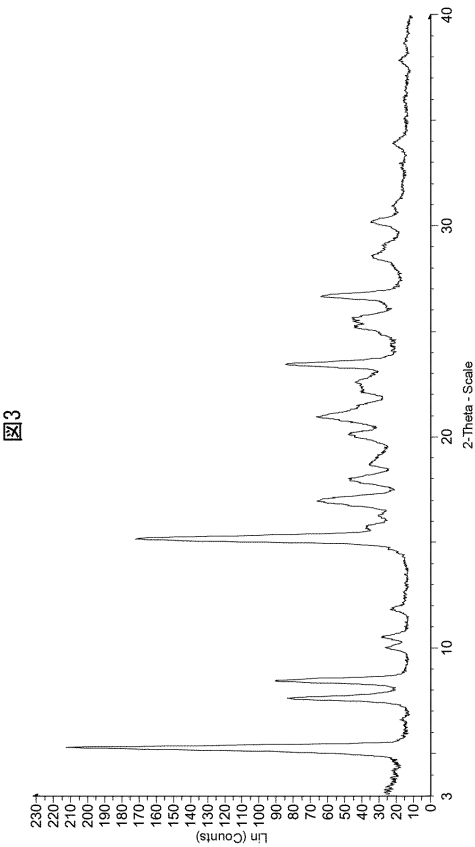
【図面】
【図 1】



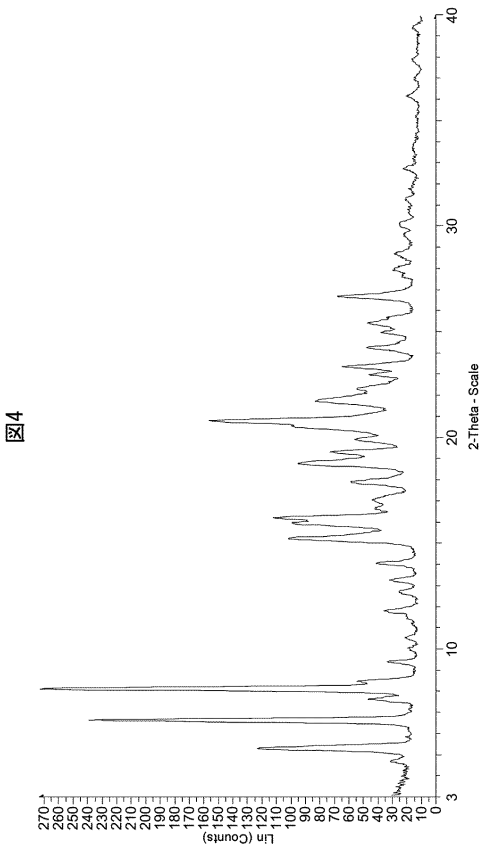
【図 2】



【図 3】



【図 4】



10

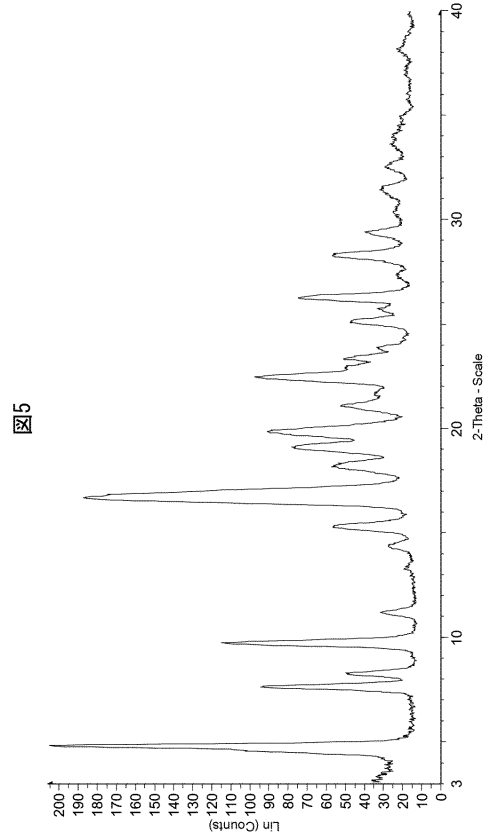
20

30

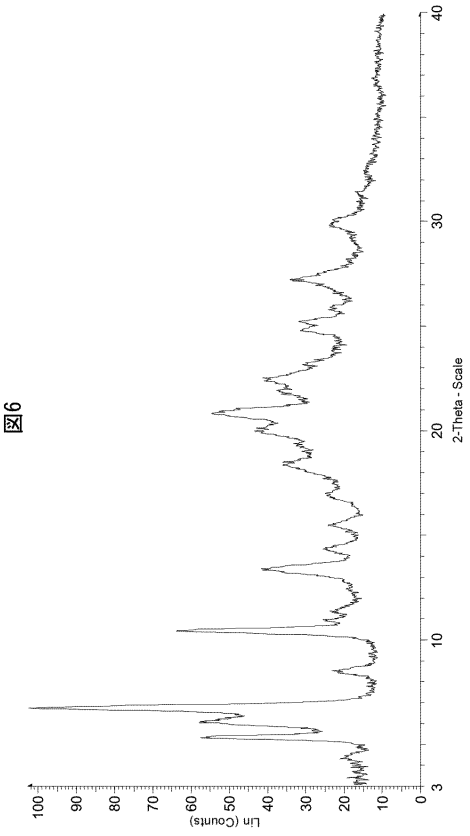
40

50

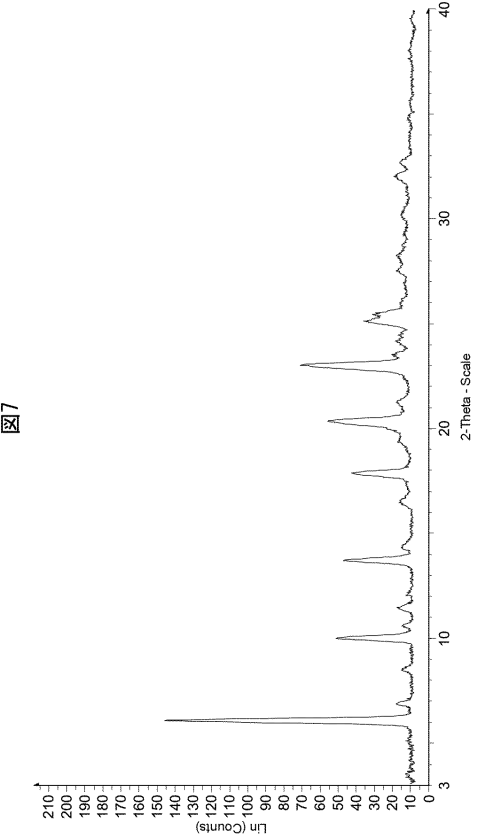
【図 5】



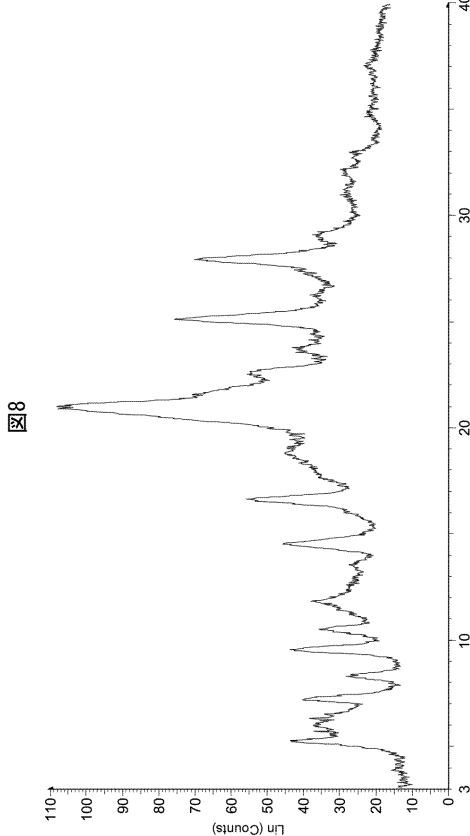
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

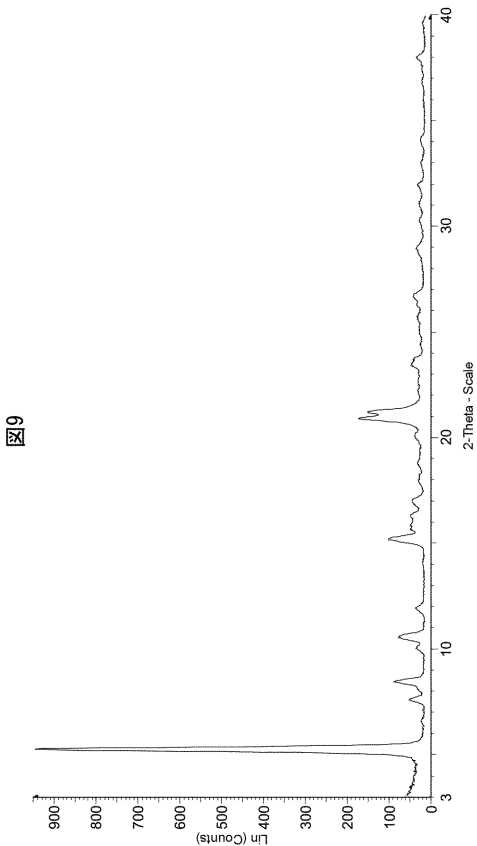
20

30

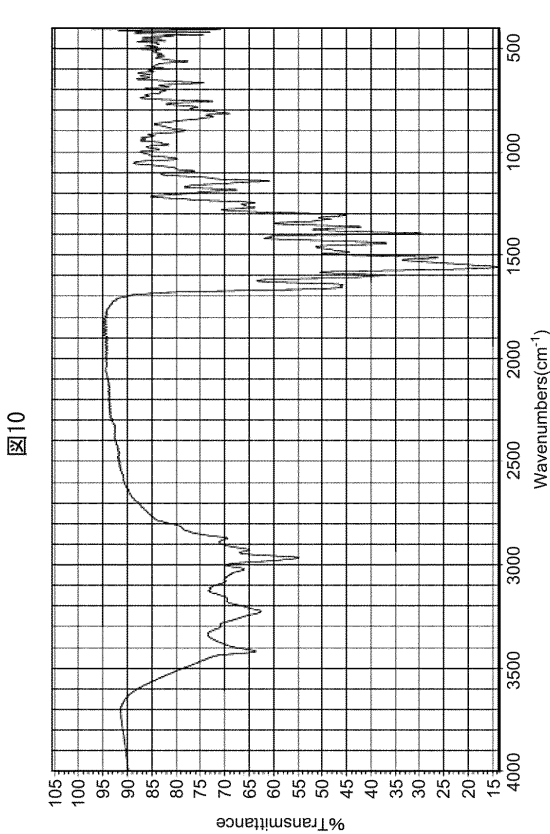
40

50

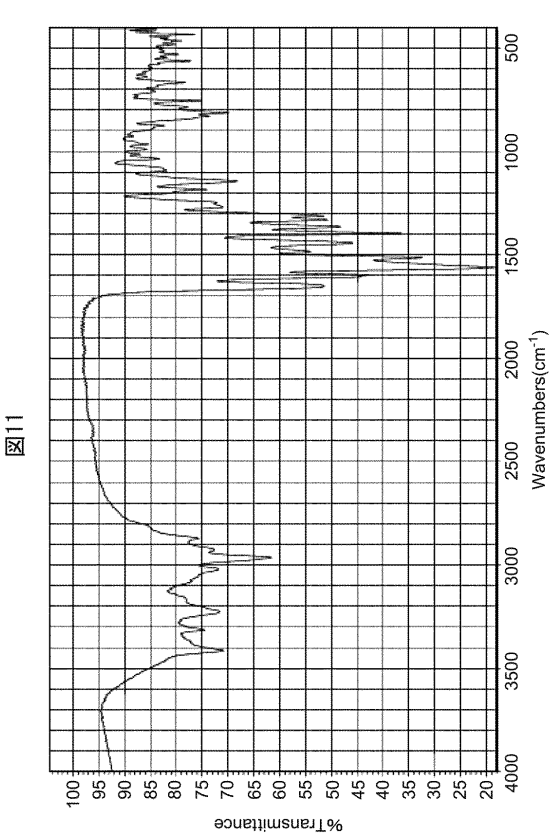
【図 9】



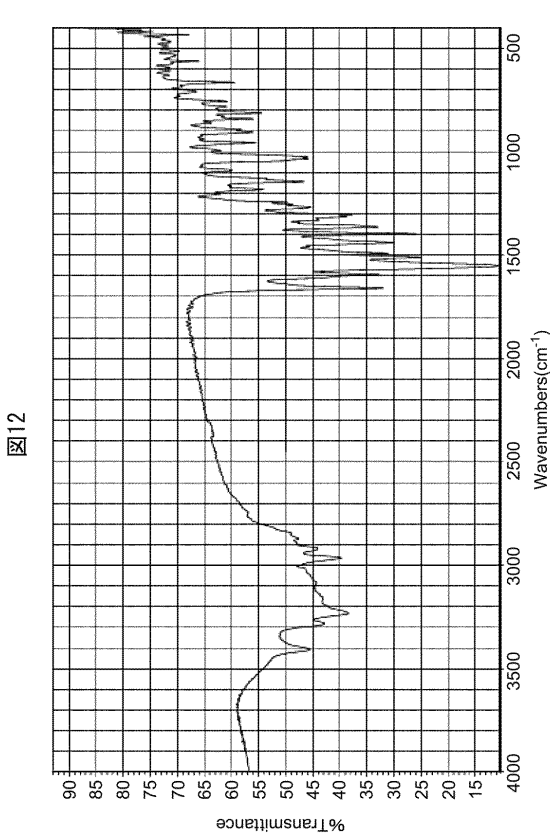
【図 10】



【図 11】



【図 12】



10

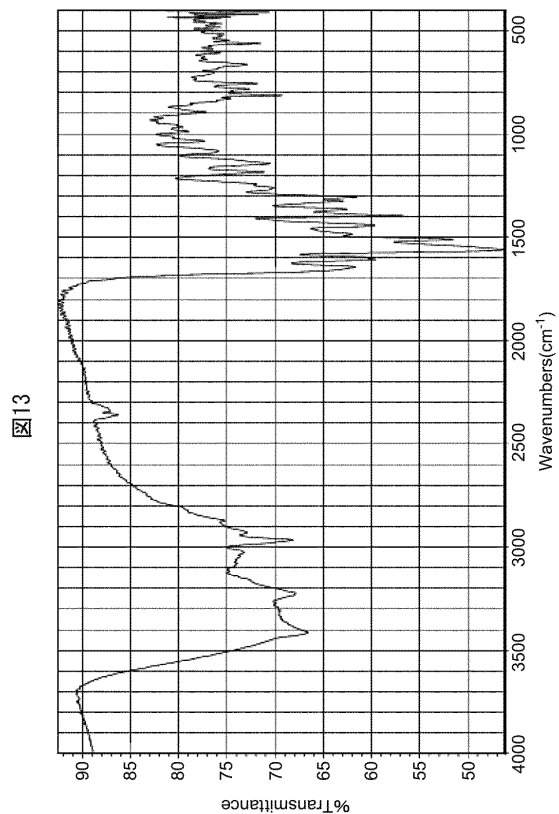
20

30

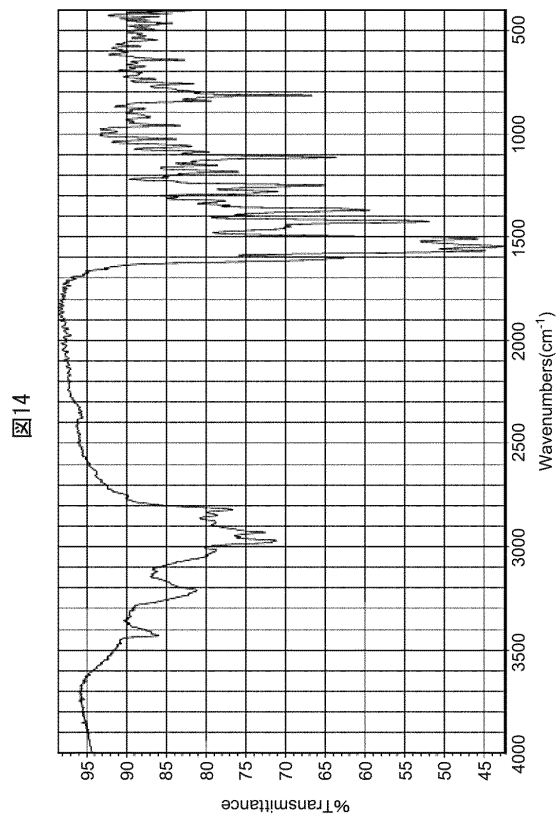
40

50

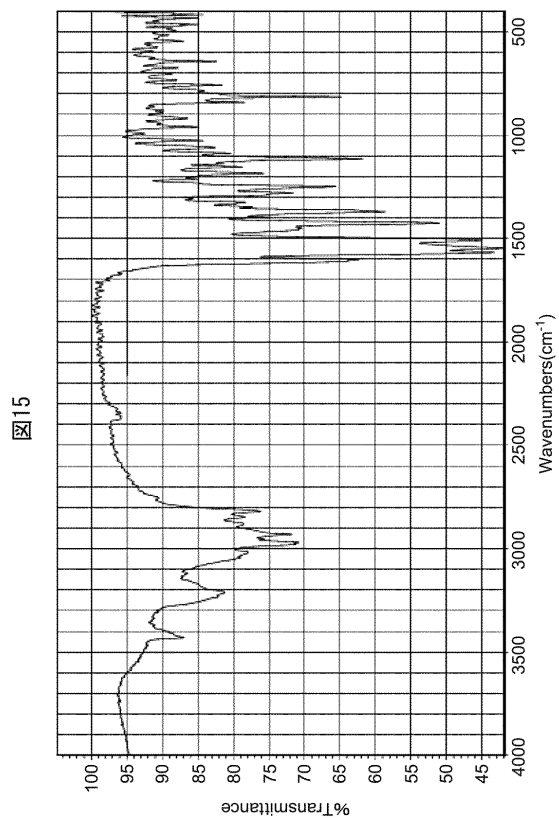
【図 1 3】



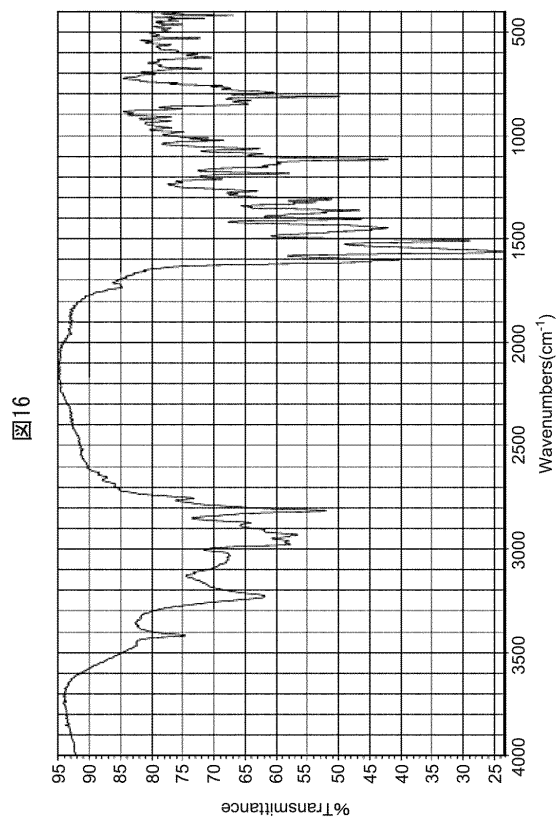
【図 1 4】



【図 1 5】



【図 1 6】



10

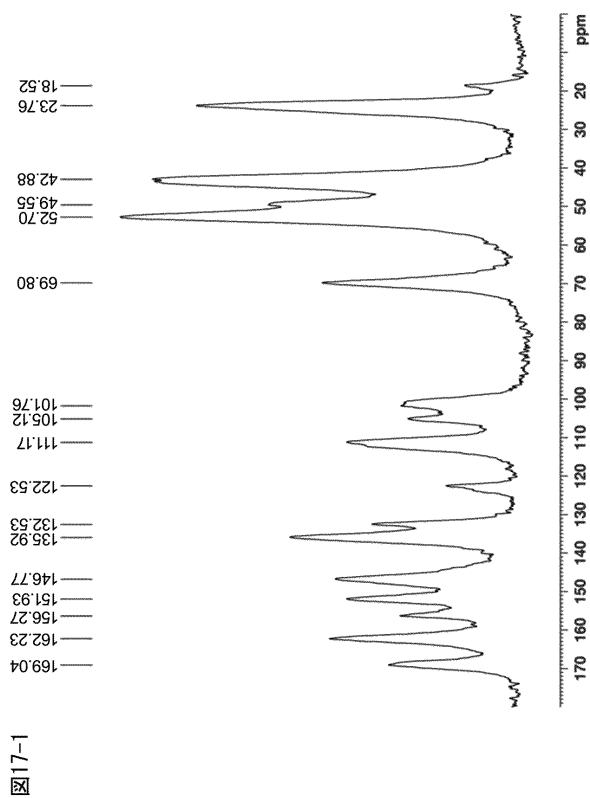
20

30

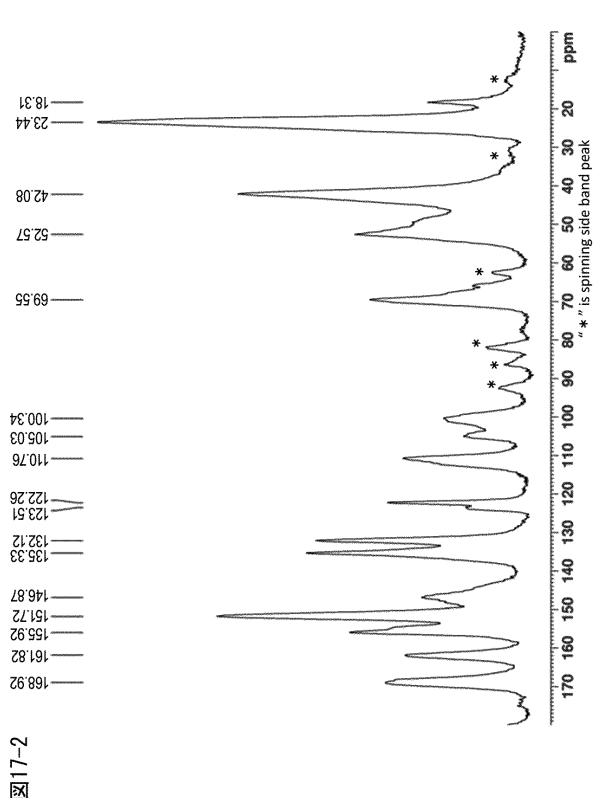
40

50

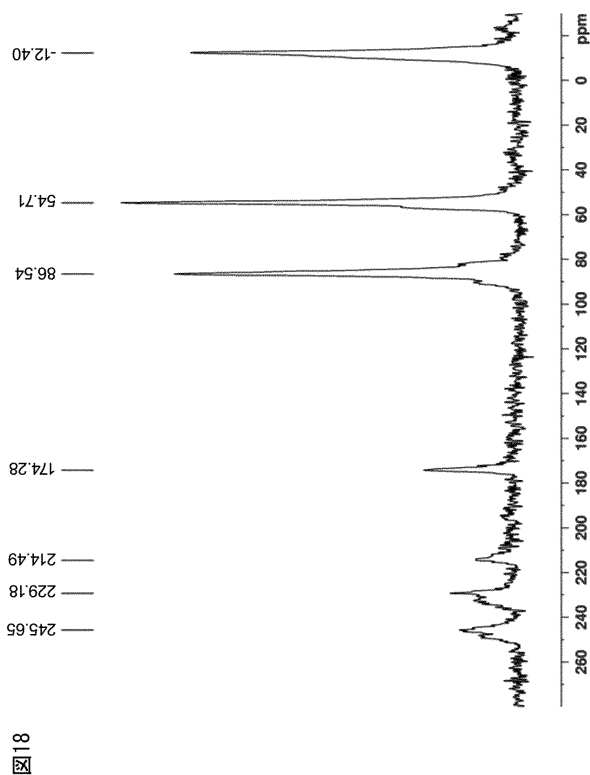
【図 17-1】



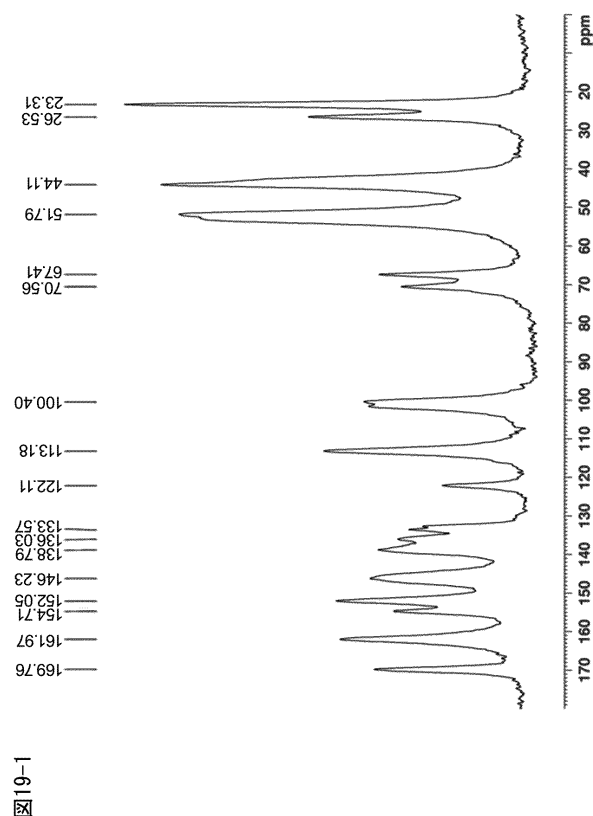
【図 17-2】



【図 18】



【図 19-1】



10

20

30

40

50

【図 20】

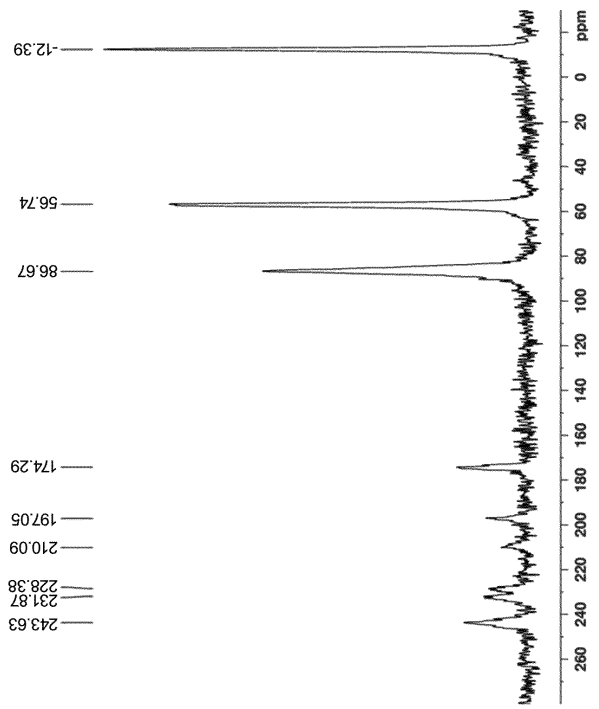


図 20

【図 21-2】

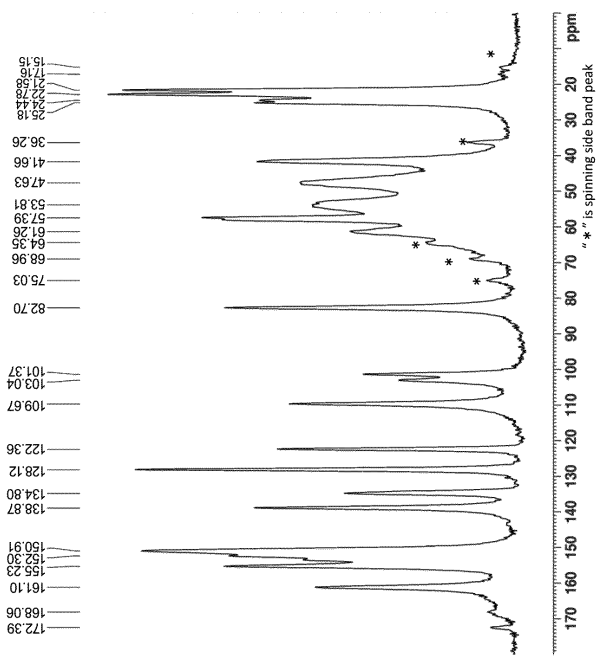


図 21-2

【図 19-2】

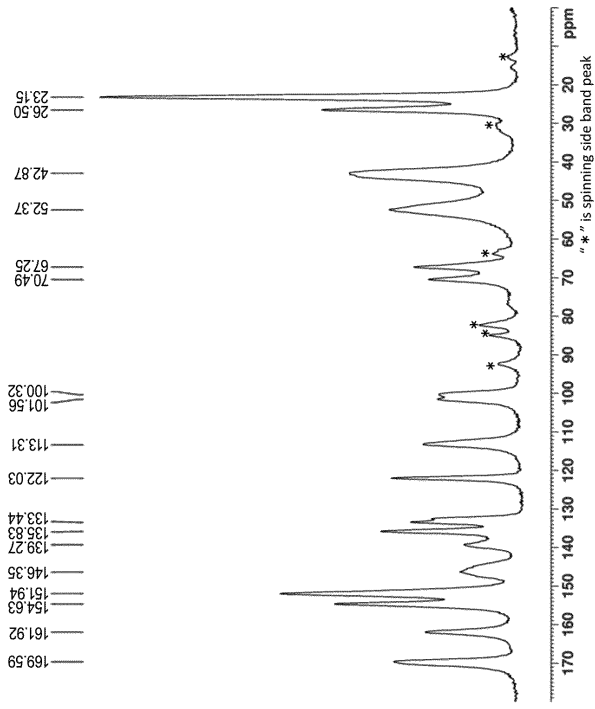


図 19-2

【図 21-1】

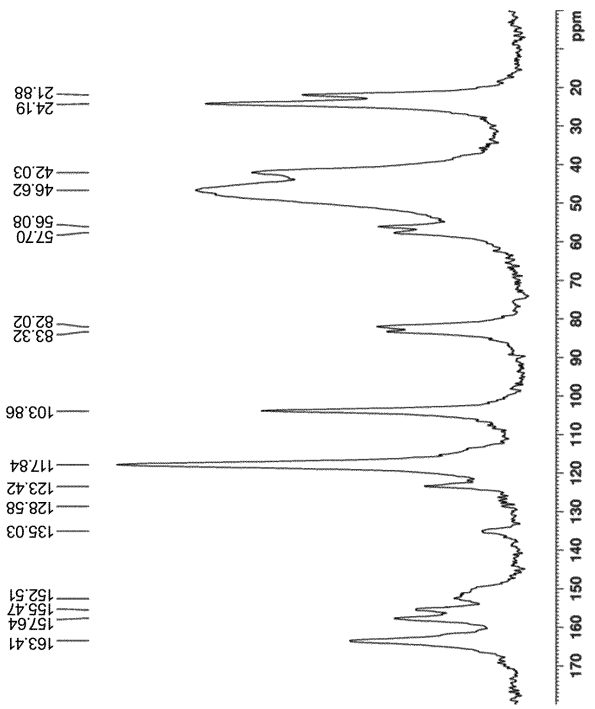


図 21-1

10

20

30

40

50

【図 2 3 - 1】

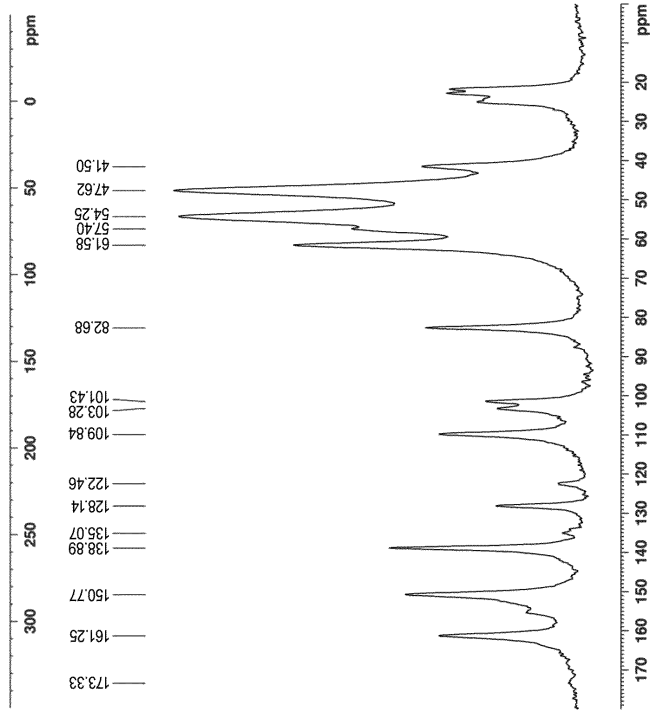


図 23-1

【図 2 2】

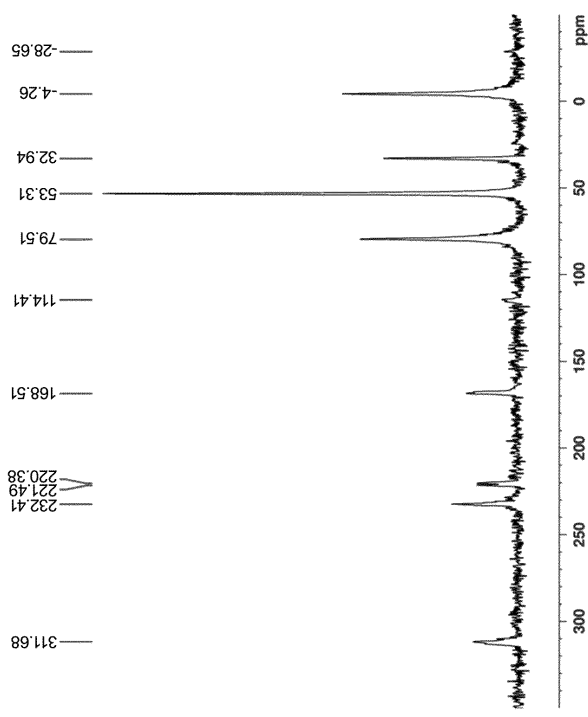


図 22

【図 2 4】

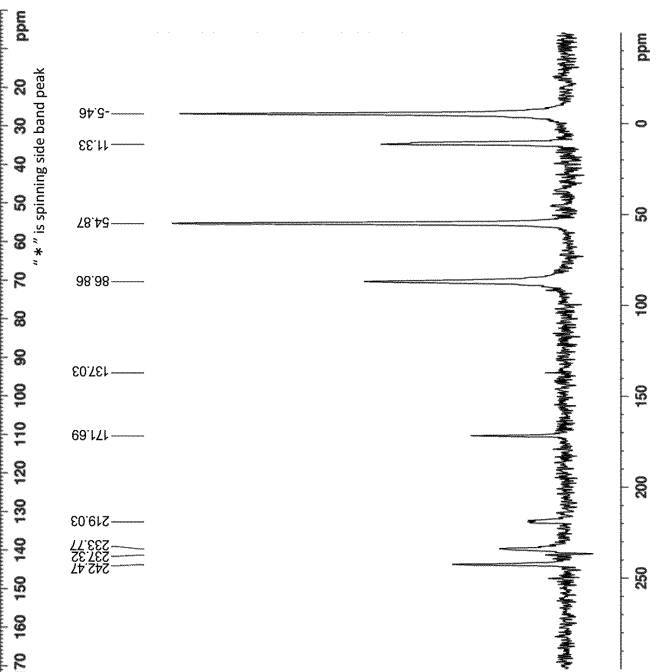


図 24

【図 2 3 - 2】

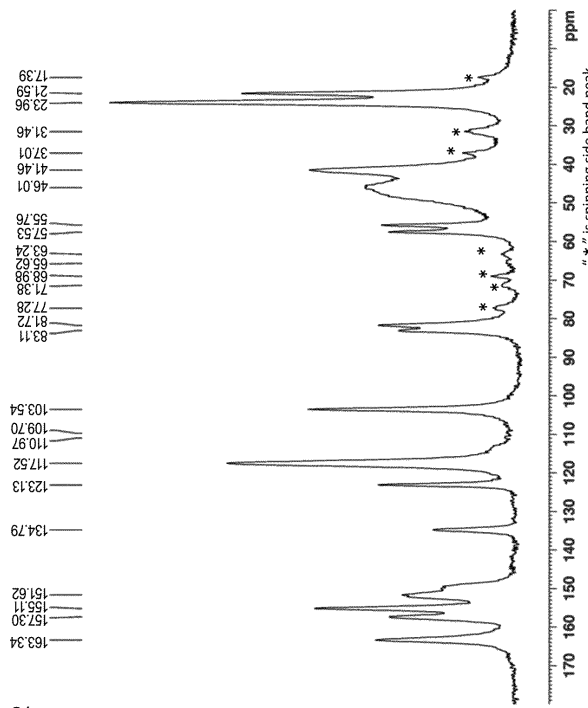


図 23-2

10

20

30

40

50

フロントページの続き

- 帝人ファーマ株式会社内
- (72)発明者 水野 剛志
東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 帝人ファーマ株式会社内
- (72)発明者 鵜木 元
東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 帝人ファーマ株式会社内
- (72)発明者 宮澤 佑貴
東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 帝人ファーマ株式会社内
- (72)発明者 矢嶋 直樹
東京都千代田区霞が関三丁目2番1号 帝人ファーマ株式会社内
- 審査官 伊佐地 公美
- (56)参考文献 特許第6400196(JP, B2)
特表2016-530274(JP, A)
特表2006-516561(JP, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07D
CAplus/REGISTRY(STN)