

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5240476号
(P5240476)

(45) 発行日 平成25年7月17日 (2013. 7. 17)

(24) 登録日 平成25年4月12日 (2013. 4. 12)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 C 231/12	(2006. 01)	C O 7 C 231/12
C O 7 C 237/06	(2006. 01)	C O 7 C 237/06
C O 7 C 249/02	(2006. 01)	C O 7 C 249/02
C O 7 C 251/24	(2006. 01)	C O 7 C 251/24
C O 7 C 45/65	(2006. 01)	C O 7 C 45/65

請求項の数 38 (全 49 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2009-515731 (P2009-515731)
(86) (22) 出願日	平成19年6月8日 (2007. 6. 8)
(65) 公表番号	特表2009-541232 (P2009-541232A)
(43) 公表日	平成21年11月26日 (2009. 11. 26)
(86) 国際出願番号	PCT/EP2007/005105
(87) 国際公開番号	W02007/147491
(87) 国際公開日	平成19年12月27日 (2007. 12. 27)
審査請求日	平成22年6月4日 (2010. 6. 4)
(31) 優先権主張番号	06012565.5
(32) 優先日	平成18年6月19日 (2006. 6. 19)
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者	504082069 ニューロン・ファーマシューティカルズ・ エッセ・ビー・アー イタリア国、イー・20091・ブレッソ (ミラノ)、ピア・エル・アリオスト、21
(74) 代理人	100103920 弁理士 大崎 勝真
(74) 代理人	100114188 弁理士 小野 誠
(74) 代理人	100140523 弁理士 渡邊 千尋
(74) 代理人	100119253 弁理士 金山 賢教
(74) 代理人	100124855 弁理士 坪倉 道明

最終頁に続く

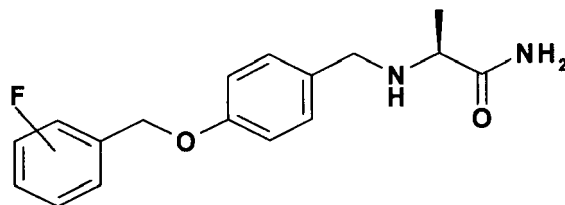
(54) 【発明の名称】 2 - [4 - (3 - 及び 2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I a) 又は (I b) :

【化 1】

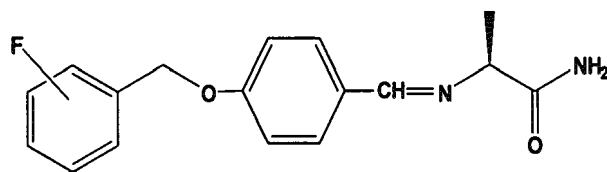


サフィナミド (I a) : 3 - F

ラルフィナミド (I b) : 2 - F

の高純度 (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (サフィナミド) 又は (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (ラルフィナミド) 又は 医薬的に許容可能な酸とのその塩の製造方法であって、それぞれの式 (V I a) 又は (V I b) :

【化 2】



(VIa): 3-F

(VIb): 2-F

10

のシッフ塩基中間体をプロトン性有機溶媒中、不均一触媒の存在下で水素ガスにより接触水素化し、サフィナミド又はラルフィナミドが遊離塩基形態で得られる場合には、場合により前記遊離塩基を医薬的に許容可能な酸とのその塩に変換することを特徴とする前記方法。

【請求項 2】

接触水素化が低級脂肪族 ($C_1 - C_5$) アルカノールから選択される溶媒の存在下で不活性担体に担持したニッケル、ロジウム、白金及びパラジウム触媒から選択される水素化触媒を使用することにより実施される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

溶媒がメタノール、エタノール及びイソプロパノールから選択される、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

触媒がパラジウム又は白金触媒である、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

触媒が白金触媒である、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

触媒が含水 5 % Pt / C (50 % H_2O) 又は含水 10 % Pd / C (50 % H_2O) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

触媒が含水 5 % Pt / C (50 % H_2O) である、請求項 6 に記載の方法。

30

【請求項 8】

医薬的に許容可能な酸がメタンスルホン酸である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

水素圧が 1 ~ 10 バールであり、温度が 10 ~ 70 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

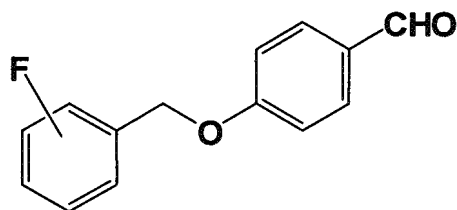
水素圧が 3 ~ 6 バールであり、温度が 25 ~ 40 である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

接触水素化が 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V a) 又は 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V b) :

40

【化 3】



(IVa):3-F (IVb):2-F

をプロトン性有機溶媒の存在下に L - アラニンアミドでイミノアルキル化することにより
予め製造する Schiff 塩基中間体 (VI a) 又は (VI b) で実施される、請求項 1 ~ 10
のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

L - アラニンアミドが遊離 L - アラニンアミドをその塩から析出させるために十分な量
の塩基の存在下でその酸付加塩として使用される、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

Schiff 塩基中間体の接触水素化が、前記 Schiff 塩基中間体の同一反応溶媒懸濁液を得る
ために前記中間体の沈殿を生じる条件下でイミノアルキル化反応の完了により得られる同
一反応混合物で実施される、請求項 11 に記載の方法。

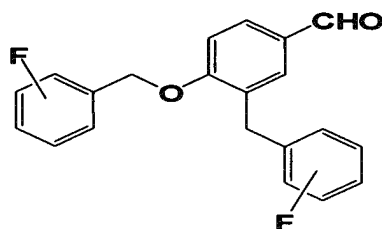
【請求項 14】

イミノアルキル化反応の完了により得られる Schiff 塩基中間体を接触水素化段階前に単
離する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

式 (VI a) 又は (VI b) の Schiff 塩基中間体を得るために出発材料として使用する
式 (IV a) 又は (IV b) の 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド又
は 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドは、0.03% 未満 (重量) の
それぞれの不純物 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)
ベンズアルデヒド (Va) 又は 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベン
ジルオキシ) ベンズアルデヒド (Vb) :

【化 4】



(Va):3-F (Vb):2-F

を含有している、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

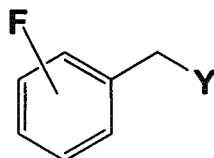
【請求項 16】

式 (IV a) 又は (IV b) の 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド
又は 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドは、0.01% (重量) 以下
のそれぞれの不純物の (Va) または (Vb) を含有している、請求項 15 に記載の方法

【請求項 17】

4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IV a) 又は 4 - (2 - フル
オロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IV b) が 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドを
塩基の存在下にそれぞれ 3 - フルオロベンジル又は 2 - フルオロベンジル誘導体 (II a)
又は (II b) :

【化 5】

**(IIIa): 3-F****(IIIb): 2-F**

[式中、YはCl、Br、I、OSO₂CH₃及びOSO₂-C₆H₄-pCH₃から選択される脱離基である] でアルキル化することにより得られ、連続反応段階で使用する前に結晶化させる、請求項 15 に記載の方法。

10

【請求項 18】

YがClである、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

結晶化が 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IV a) 又は 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IV b) の不活性有機溶媒溶液に不活性有機非溶媒を加えることにより実施される、請求項 17 及び 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

20

不活性有機非溶媒が n - ヘキサンであり、不活性有機溶媒がトルエンである、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

結晶化が 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IV a) 又は 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IV b) を高温溶媒に溶かす後、溶液を室温に冷却することにより実施される、請求項 17 及び 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 22】

溶媒が還流下のシクロヘキサン又はジ (C3 - C4) アルキルエーテルである、請求項 21 に記載の方法。

30

【請求項 23】

溶媒がジイソプロピルエーテルである、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

溶液を 10 ~ 15 °C に冷却する、請求項 21 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

アルキル化反応が相間移動条件下で実施される、請求項 17 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

相間移動条件下のアルキル化が、試薬と相間移動触媒を有機液相に溶かし、固相を無機塩基又は前記無機塩基との 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドの塩から構成した固 / 液系で実施される、請求項 25 に記載の方法。

40

【請求項 27】

相間移動条件下のアルキル化が、式 (III a) 又は (III b) のアルキル化試薬 3 - フルオロベンジル又は 2 - フルオロベンジル誘導体を有機液相に溶かし、4 - ヒドロキシベンズアルデヒドを無機塩基との塩として水相に溶かす液 / 液系で実施される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

相間移動触媒が第 4 級アンモニウム又はホスホニウム塩又はポリエチレングリコール 400 から選択される、請求項 25 ~ 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

50

相間移動触媒の使用量が 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド 1 モル当たり 0 . 0 2 ~ 1 モルである、請求項 2 8に記載の方法。

【請求項 3 0】

相間移動触媒の使用量が 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド 1 モル当たり 0 . 1 ~ 1 モルである、請求項 2 9に記載の方法。

【請求項 3 1】

有機液相の有機溶媒がジアルキルエーテル及び芳香族炭化水素から選択される、請求項 2 6 ~ 3 0のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 2】

式 (I I I a) 又は (I I I b) のアルキル化試薬と 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドのモル比が 0 . 6 ~ 1 . 5 である、請求項 2 6 ~ 3 1のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 3 3】

温度が 6 0 ~ 1 6 0 である、請求項 2 6 ~ 3 2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 4】

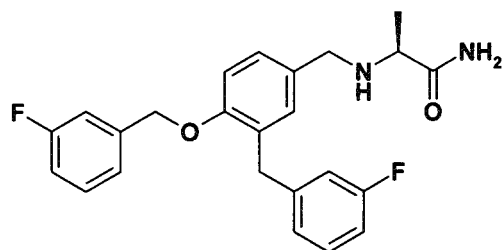
無機塩基が Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 NaOH 及び KOH から選択され、温度が 8 0 ~ 1 2 0 であり、式 (I I I a) 又は (I I I b) のアルキル化試薬と 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドのモル比が 0 . 9 ~ 1 . 1 である、請求項 2 6 ~ 3 3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 5】

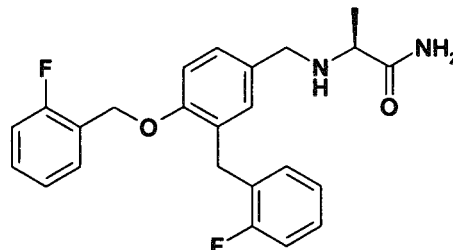
サフィナミドもしくはラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸とのその塩は、0 . 0 3 % 未満 (重量) のそれぞれの不純物 (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (I I a) 又は (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (I I b) :

20

【化 6】



(IIa)



(IIb)

30

又は医薬的に許容可能な酸とのその塩を有する、請求項 1 ~ 3 4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 3 6】

サフィナミド若しくはラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸とのその塩は、0 . 0 1 % (重量) 未満のそれぞれの不純物 (I I a) または (I I b) 又は医薬的に許容可能な酸とのその塩を有する、請求項 3 5に記載の方法。

40

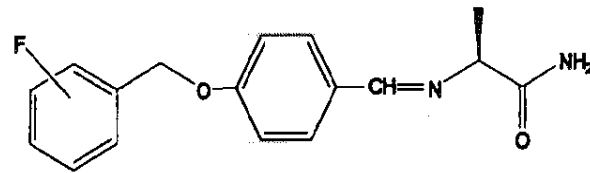
【請求項 3 7】

医薬的に許容可能な酸がメタンスルホン酸であり、メタンスルホン酸との塩としての式 (I I a) 及び (I I b) のそれぞれの不純物の含量が 0 . 0 1 % (重量) 未満である、請求項 3 5 又は 3 6に記載の方法。

【請求項 3 8】

式 (V I a) 又は (V I b) :

【化 7】



(VIa): 3-F (VIb): 2-F

の単離されるシッフ塩基。

10

【発明の詳細な説明】

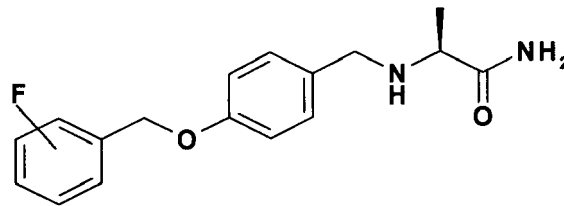
【技術分野】

【0001】

本発明は (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド即ちサフィナミド (I a) 及び (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド即ちラルフィナミド (I b) :

【0002】

【化 1】

サフィナミド (I a) : 3-F
ラルフィナミド (I b) : 2-F

20

とそれらの塩を高収率と非常に高いエナンチオマー純度及び化学純度で製造するための新規方法に関する。

【0003】

30

本方法はこれらの大量生産にも非常に有用である。

【背景技術】

【0004】

サフィナミド (NW - 1015 , FCE - 26743A , PNU - 151774E) はナトリウムチャンネル遮断薬、カルシウムチャンネルモジュレーター、モノアミノオキシダーゼ B (MAO - B) 阻害剤、グルタミン酸放出阻害剤及びトーパミン代謝モジュレーターである。

【0005】

サフィナミドは CNS 障害、特に癲癇、パーキンソン病、アルツハイマー病、鬱病、不穏下肢症候群及び偏頭痛の治療に有用である (WO90 / 14334 、 WO04 / 089353 、 WO05 / 102300 、 WO04 / 062655) 。

40

【0006】

ラルフィナミド (NW - 1029 , FCE - 26742A , PNU - 0154339E) は慢性疼痛と神経因性疼痛を含む疼痛症状、偏頭痛、双極性障害、鬱病、心臓血管障害、炎症性障害、尿生殖器障害、代謝障害及び胃腸障害の治療に有用なナトリウムチャンネル遮断薬である (WO99 / 35125 、 WO03 / 020273 、 WO04 / 062655 、 WO05 / 018627 、 WO05 / 070405 、 WO05 / 102300 、 WO06 / 027052) 。

【0007】

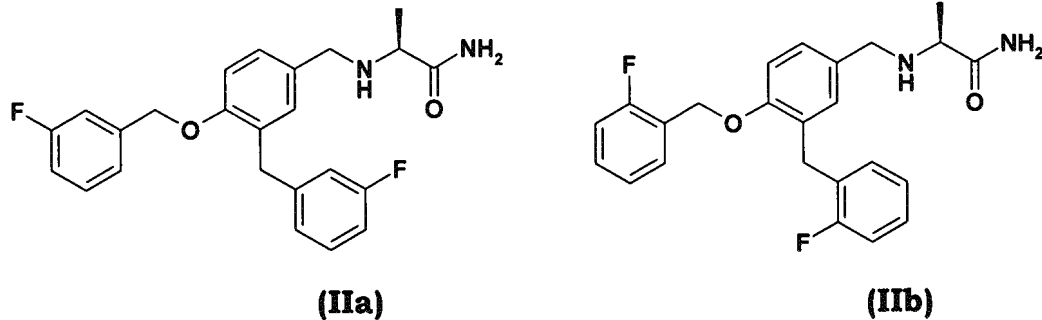
従来技術に記載されている方法によるサフィナミドとラルフィナミドの大規模調製物は

50

2種類の望ましくない不純物としてそれぞれ(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(IIa)及び(S)-2-[3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(IIb)：

【0008】

【化2】



10

とそれらの塩、特にそれぞれのメタンスルホン酸塩(IIe)及び(IId)を含有していることが今回判明した。

【0009】

上記2種類の不純物は非常に高毒性であるため、この事実は特に問題である。

20

【0010】

薬剤候補の多くは望ましくない不純物に起因するヒト代謝への予想外の影響又は毒性により臨床試験に失敗しており、従って、初期前臨床段階でこのような不純物を除去することが重要であり、極めて望ましい。

【0011】

前臨床段階では、薬剤代謝酵素との相互作用、細胞毒性、代謝安定性及びプロファイリング、膜浸透性、固有クリアランス並びにヒトether-a-go-go関連遺伝子(HERG)チャネル遮断等の非常に十分に確立された一連のin vitroアッセイを使用して新規化合物の「薬剤適性」を評価することができる。

【0012】

30

チトクロームP450(CYP450)系は薬剤、発癌物質及び環境汚染物質を含む親油性生体異物の代謝の主要酵素系である。CYP450は多くの組織に存在するが、肝臓に最高濃度で存在するヘム含有膜結合多酵素系である。ヒト肝臓には、15~20種類の異なる生体異物代謝性CYP450種が存在すると推定される。これまでに、14種類を上回るCYP遺伝子ファミリーが哺乳動物で同定されている。高い相同性が存在するにも拘わらず、広範な研究の結果、各CYPファミリー及びサブファミリーは生体異物代謝において異なる役割をもつことが判明した。CYP1、CYP2及びCYP3の3種類のCYPファミリーがヒト肝ミクロソームCYPの約70%を占め、そのうちCYP3が約30%を占める。これらのCYPは大半の市販薬の代謝に最も大きく関与している。

【0013】

40

CYP1ファミリーはCYP1A1、CYP1A2及びCYP1B1等の数個のメンバーを含み、アセトアミノフェン、クロミプラミン及びイミプラミンの代謝に関与している。

【0014】

CYP2ファミリーはCYP2A、CYP2B、CYP2C、CYP2D及びCYP2E等の数個のサブファミリーを含む。CYP2Cサブファミリーは少なくとも7個のメンバーを含む。CYP2C9はイブプロフェン、ジクロフェナク、トルブタミド及びトラセミドの代謝に関与している。CYP2C19はジアゼパムとオメプラゾールの代謝の主要アイソザイムである。CYP2D6は抗鬱薬、心臓血管薬及び抗精神病薬を含む市販薬剤の30%以上の代謝に関与していることが分かっている。CYP3ファミリーでは、3種

50

類のアイソフォームがヒト肝臓で同定されている。ヒトCYP3A4は薬剤代謝における最も重要なアイソフォームであるとして認められている。今日までに、CYP3A4により触媒される代謝は市販薬剤の約50%の主要な排泄経路である。

【0015】

CYP3A4とCYP2D6はいずれも薬剤代謝における重要性により、薬剤間相互作用に関与していることが多く、数種類の臨床使用されている化合物がそれぞれケトコナゾール、テルフェナジン、エリスロマイシン、ミコナゾール、プロプラノロール及びキニジン等のこれらのCYP450アイソフォームの強力な阻害剤として同定されている。このため、これらの薬剤の使用は明白に制限される。

【0016】

非抗不整脈薬の作用の副作用としての突然死からなる更なる問題は、医薬産業と保健行政当局が直面する薬理安全性の大問題である。近年では、突然死の報告により少なくとも5品目の超大型新薬（アステミゾール、セルチンドール、テルフェナジン、シサプリド、グレパフロキサシン）が市場から撤退している。「torsades de pointes」は自然に心室細動に悪化して突然死の原因となり得る多形性心室頻拍であるが、いずれの場合も、心電図におけるQT間隔の延長を特徴とする心筋再分極異常であるQT延長症候群（LQTS）がその素因とみなされている。先天性LQTSはナトリウムチャンネルと2種類の異なるカリウムチャンネルである急速活性化遅延整流カリウムチャンネル（ I_{Kr} ）及び緩徐活性化遅延整流カリウムチャンネル（ I_{Ks} ）の欠損をもたらす数箇所の可能な突然変異に起因すると考えられる。重要な点として、薬剤暴露に関連する心筋活動電位持続時間の延長（後天性LQTS）のほぼ全症例は心筋内の I_{Kr} 電流の遮断という同一の特定メカニズムに起因すると考えられる。QT間隔の終点の第3相再分極の要因であるこの電流は各サブユニットがHERGによりコードされる四量体チャンネルを流れる。HERG K^+ チャンネルの遮断は薬剤誘発性QT延長の主原因であると広く認められているので、この望ましくない副作用をもつ化合物の早期検出は医薬産業における重要な課題となっている。

【0017】

薬剤代謝酵素、特にCYP450酵素の強力な阻害剤であると共にHERGチャンネル遮断性をもつ化合物は毒性である確率が高く、その開発を早期に停止する必要がある。

【0018】

表1に示すように、メタンスルホン酸塩（IIc及びIId）としての不純物（IIa及びIIb）はマイクロモル以下の範囲でCYP3A4、CYP2D6、CYP2C19、CYP2C9及びHERG電流を強く阻害し、本発明の方法を使用して合成された高純度サフィナミドメタンスルホン酸塩（Ic）及びラルフィナミドメタンスルホン酸塩（Id）に比較して細胞毒性が高い。

【0019】

【表1】

表1

化合物	Herg IC ₅₀ , μM	細胞毒性 IC ₅₀ , μM	CYP3A4 IC ₅₀ , μM	CYP2D6 IC ₅₀ , μM	CYP2C19 IC ₅₀ , μM	CYP2C9 IC ₅₀ , μM	CYP1A2 IC ₅₀ , μM
不純物IIc	1.20	6.70	0.05	0.77	0.42	7.29	>40
サフィナミド メタンスルホン酸塩	27.0	248.0	>40	>40	23.85	>40	>40
不純物IId	2.66	15.0	0.05	0.92	1.89	8.01	>40
ラルフィナミド メタンスルホン酸塩	18.0	>300	>40	>40	>40	>40	>40

【0020】

表2は本発明の新規方法を使用して合成された高純度サフィナミド及びラルフィナミドメタンスルホン酸塩と、それぞれ0.3%の不純物IIc及びIIdの存在下で同一方法により得られたサフィナミド及びラルフィナミドを使用したチトクロームCYP3A4の阻害に関する比較結果(IC₅₀)を示す。

【0021】

0.3%の不純物IIc及びIIdを高純度サフィナミド及びラルフィナミドメタンスルホン酸塩に加えると、どちらの場合もCYP3A4のIC₅₀の著しい低下が観察され、不純物が酵素活性の強い阻害の一因であることが分かる。

【0022】

【表2】

10

表2

化合物	CYP3A4 IC ₅₀ , μ M
サフィナミドメタンスルホン酸塩	>40
サフィナミドメタンスルホン酸塩+0.3%不純物IIc	18
ラルフィナミドメタンスルホン酸塩	>40
ラルフィナミドメタンスルホン酸塩+0.3%不純物IId	7.76

【0023】

20

表3に示すように、不純物(IIc)は3mg/kg ipからマウス最大電気ショック(MES)試験における死亡率を増加させ、薬理活性即ち痙攣からの保護は認められなくなる。

【0024】

【表3】

表3

化合物	MES					
	3mg/kg ip		10mg/kg ip		30mg/kg ip	
	%保護	死/生	%保護	死/生	%保護	死/生
サフィナミド メタンスルホン酸塩	50	0/10	100	0/10	100	0/10
不純物IIc	0	5/10	0	4/10	0	4/10

30

【0025】

表4は最大電気ショック試験(MES)で10及び20mg/kgを経口投与した場合の不純物IIdが同一用量のラルフィナミドメタンスルホン酸塩に比較してマウスを痙攣から保護しないことを報告する。

【0026】

【表4】

40

表4

化合物	MES			
	10mg/kg p.o.		20mg/kg p.o.	
	%保護	死/生	%保護	死/生
ラルフィナミドメタンスルホン酸塩	60%	0/10	90%	0/10
不純物IId	0%	0/10	0%	0/10

【0027】

これらの全データによると、それぞれWO90/14334及びPevarelloら

50

, J. Med. Chem., 1998, 41, 579-590 に記載の方法により合成された サフィナミド 及び ラルフィナミド 中に存在する不純物 II c 及び II d は細胞毒性、CYP450 の所定のアイソフォームの強力な阻害、HERG チャンネル遮断及び癲癇の「in vivo」モデルにおける保護活性の不在等の数種の望ましくない in vitro 特徴を示す。

【0028】

CYP の重要な側面の 1 つは異なる集団群間の変動である。薬剤代謝の変動は臨床試験で非常に重要である。CYP3A4 と CYP2D6 の酵素活性は異なる民族集団間で著しく相違し、同一民族集団でも個体間で著しく相違する。個体間の CYP 活性の差は各アイソザイムにより著しく異なる。各個体の CYP 発現レベルの相違により薬剤代謝も変動する可能性がある。更に重要な点として、多形の結果として酵素活性の増減した CYP 酵素が生じ、薬剤代謝の変動につながる可能性もある。CYP2D6 多形は薬剤代謝で詳しく研究されている事項である。臨床試験では、最初に抗高血圧薬と抗癲癇薬の代謝で個体間の顕著な変動が認められた。欠損 CYP2D6 対立遺伝子を保有する個体では CYP2D6 で代謝された薬剤の排泄が遅い。代謝の遅い個体は低代謝能群 (PM) に分類され、代謝のよい個体は高代謝能群 (EM) と呼ばれ、異なる人種に由来する集団における PM 表現型の発生率は異なり、白人では約 5 ~ 10 % が PM 表現型であるが、アジア人は 1 % に過ぎない。臨床関連で重要な別の多形アイソフォームは CYP2C19 である。

【0029】

これらの点を考慮すると、CYP450 アイソフォームに干渉しない (阻害も誘導もしない) 化合物は臨床医療で薬剤間相互作用の危険が非常に低く、医師が簡単且つ安全に処方することができる。

【0030】

特に、CYP450 系のチトクロームに干渉しない薬剤は低代謝能群 (PM) に分類される個体の治療処置又は前記チトクロームと相互作用することが分かっている他の薬剤 (例えば ケトコナゾール、テルフェナジン、エリスロマイシン、ミコナゾール、プロプラノロール 及び キニジン) 及び / 又は HERG チャンネル遮断性をもつことが分かっている他の薬剤を同時に投与している患者の治療処置に特に指定される。

【0031】

一般臨床医療によると、サフィナミド 及び ラルフィナミド メタンスルホン酸塩 (II c 及び II d) は通常、これを必要とする患者に一日数回に分けて長期間投与される。これは特に治療する疾患がパーキンソン病、アルツハイマー病及び不穏下肢症候群 (サフィナミド の場合) や、慢性もしくは神経因性疼痛、心臓血管障害又は炎症性障害 (ラルフィナミド の場合) である治療用途の場合に該当する。1 日用量は特定症状と患者の必要により異なるが、サフィナミド メタンスルホン酸塩の 1 日用量は通常 10 mg / 日 ~ 800 mg / 日とすることができ、ラルフィナミド メタンスルホン酸塩の 1 日用量は通常 10 mg / 日 ~ 1 g / 日とすることができ。これらの条件下で上記に報告したデータを考慮すると、サフィナミド 及び ラルフィナミド 又はその塩の医薬製剤中の不純物 (II a) 及び (II b) 又はその塩、特にメタンスルホン酸塩 (II c) 及び (II d) の濃度をできるだけ低く維持することが強く推奨され、いずれの場合もそれぞれ サフィナミド 及び ラルフィナミド 又はその塩、特にメタンスルホン酸塩の量に対して 0.03 % 未満、好ましくは 0.01 重量 % とする。

【0032】

本発明者らが実施した調査と実験研究の結果、従来技術により製造された サフィナミド 及び ラルフィナミド 並びに医薬的に許容可能な酸とのそれぞれの塩は 0.03 重量 % を上回るそれぞれの不純物 (II a) 及び (II b) 又は医薬的に許容可能な酸とのそれぞれの塩、例えば (II c) 及び (II d) を含有していることが判明した。従って、上記生成物は安全な治療用途には不適切である。特に、不純物 (II a)、(II b)、及び医薬的に許容可能な酸とのそれぞれの塩の含量が上記活性物質に対して 0.03 % 以上、好ましくは 0.01 重量 % を上回る サフィナミド もしくは ラルフィナミド 又は医薬的に許容

可能な酸とのその塩を含有する医薬製剤は医薬として不適切である。

【 0 0 3 3 】

本明細書及び特許請求の範囲において、上記範囲の値は特に指定しない限り、「活性物質」の重量百分率比、即ち治療活性物質 (I a , I b) の有効含量に対する生体活性不純物 (I I a , I I b) の有効含量の比を表すものとする。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 3 4 】

【 特許文献 1 】 W O 9 0 / 1 4 3 3 4

【 特許文献 2 】 W O 0 4 / 0 8 9 3 5 3

【 特許文献 3 】 W O 0 5 / 1 0 2 3 0 0

【 特許文献 4 】 W O 0 4 / 0 6 2 6 5 5

【 特許文献 5 】 W O 9 9 / 3 5 1 2 5

【 特許文献 6 】 W O 0 3 / 0 2 0 2 7 3

【 特許文献 7 】 W O 0 4 / 0 6 2 6 5 5

【 特許文献 8 】 W O 0 5 / 0 1 8 6 2 7

【 特許文献 9 】 W O 0 5 / 0 7 0 4 0 5

【 特許文献 1 0 】 W O 0 5 / 1 0 2 3 0 0

【 特許文献 1 1 】 W O 0 6 / 0 2 7 0 5

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 3 5 】

本発明に記載する方法では、不純物を著しく低減することにより、高い化学純度と安全性の高い生体プロファイルをもつ生成物が得られる。殆ど検出不能な他の不純物はそれぞれ化合物 (I a) 及び (I b) の製造中間体である 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V a) 及び 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V b) の合成にそれぞれ使用される市販 3 - フルオロベンジルクロリド及び 2 - フルオロベンジルクロリドに含まれる非常に少量の 2 - 及び 4 - フルオロベンジルクロリドと 3 - 及び 4 - フルオロベンジルクロリドに由来する。

【 0 0 3 6 】

本発明に記載する方法によると、サフィナミド及びラルフィナミドが高収率且つ高純度で得られ、サフィナミド及びラルフィナミド又は特にメタンスルホン酸とのその塩における (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (I I a) 及び (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (I I b) 並びに特にメタンスルホン酸とのそれらの塩 (「ジベンジル誘導体」 と総称する) の含量は 0 . 0 3 % 以下、好ましくは 0 . 0 1 % (重量) 以下である。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 3 7 】

本発明の目的である方法は 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドから出発し、
a) O - アルキル化に高度に選択的な条件下で 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドを一般式 3 - 又は 2 - F - C ₆ H ₄ - C H ₂ - Y [式中、Y は脱離基 (C l , B r , I , O S O ₂ C H ₃ 等) である] の誘導体で O - ベンジル化し、高純度の 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド及び 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを得る段階と ;
b) 塩基又は塩としての L - アラニンアミドを水素ガスと不均一触媒の存在下に 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド及び 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドで還元アルキル化し、結晶化後に非常に高いエナンチオマー純度及び化学純度でそれぞれサフィナミド及びラルフィナミドを得る段階と ;
c) 前段階で得られたそれぞれサフィナミド及びラルフィナミドの塩形成により医薬的に

10

20

30

40

50

許容可能な酸とのサフィナミド及びラルフィナミド塩を製造する段階の3段階を含む。医薬的に許容可能な酸は例えば硝酸、塩酸、臭化水素酸、硫酸、過塩素酸、リン酸、メタンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、蔞酸、マロン酸、リンゴ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸及びサリチル酸から選択される。

【0038】

本発明の別の目的は特に式(IIa)もしくは(IIb)のそれぞれのジベンジル誘導体又は医薬的に許容可能な酸、特にメタンスルホン酸とのその塩の含量が(「活性物質」に対して)0.03%未満、好ましくは0.01重量%未満であり、医薬用として適切な高純度のサフィナミド及びラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのそれらの塩を提供することである。

10

【0039】

更に、本発明の別の目的はサフィナミドもしくはラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩を活性剤として含有しており、それぞれのジベンジル誘導体(IIa)及び(IIb)又は医薬的に許容可能な酸、例えばメタンスルホン酸とのその塩の含量が上記活性物質に対して0.03%、好ましくは0.01%(重量)未満である医薬製剤を提供することである。これらの新規医薬製剤はサフィナミド及びラルフィナミドに関する薬理・毒性知識を適用しても、また従来技術で利用可能な方法に従って製造したこれらの活性剤を使用しても予想されず、達成することもできなかった。

20

【0040】

従って、上記高純度のサフィナミドもしくはラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩を含有する前記医薬製剤も本発明の別の目的である。

【0041】

上記医薬製剤は場合により上記高純度のサフィナミドもしくはラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩以外に1種類以上の他の活性剤を含有することができる。

【0042】

例えば、パーキンソン病又は不穏下肢症候群の補助治療に有用な新規医薬製剤は上記高純度のサフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩に加え、WO04/089353及びWO05/102300に記載のもの等の1種類以上の補助パーキンソン病活性剤、好ましくはドーパミンアゴニスト及び/又はレボドパ及び/又はカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ(COMT)阻害剤を含有することができる。

30

【0043】

別の例として、慢性疼痛及び神経因性疼痛を含む疼痛症状と偏頭痛の治療に有用な本発明の新規医薬製剤は上記高純度のラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩に加え、EP1423168に記載のガバペンチン及びプレガバリン又は医薬的に許容可能なその塩等の別の活性剤を含有することができる。

40

【0044】

本発明の高純度サフィナミド又はラルフィナミドを含有する医薬組成物は例えば活性化化合物を医薬治療用として不活性な有機及び/又は無機キャリアー材料と混合することにより、当分野で公知の慣用手順により製造することができる。本発明の組成物は例えば溶液、懸濁液、エマルション等の液体形態でもよいし、例えば錠剤、トローチ、カプセル、パッチ等の固体形態でもよい。

【0045】

本発明の組成物の製造に有用な適切な医薬治療用として不活性な有機及び/又は無機キャリアー材料としては、例えば水、ゼラチン、アラビアガム、ラクトース、澱粉、セルロース、ステアリン酸マグネシウム、タルク、植物油、ポリアルキレングリコール、シクロ

50

デキストリン等が挙げられる。本発明の医薬組成物は滅菌処理することができ、活性成分以外に、例えば防腐剤、安定剤、湿潤剤又は乳化剤（例えばパラフィン油）、モノオレイン酸マンニド、浸透圧調整用塩、緩衝液等の当業者に周知の他の成分を添加してもよい。

【0046】

本発明の別の目的はCNS障害、特に癲癇、パーキンソン病、アルツハイマー病及び不穏下肢症候群の治療方法として、前記治療を必要とする患者にジベンジル誘導体（IIa）又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩の含量が（「活性物質」に対して）0.03%未満、好ましくは0.01重量%未満である有効量の高純度サフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩を投与する段階を含む方法を提供することである。前記方法は治療を必要とする患者に場合により例えばドーパミンアゴニスト及び/又はレボドパ及び/又はカテコール-O-メチルトランスフェラーゼ（COMT）阻害剤等のWO2004/089353に記載されているような1種類以上のパーキンソン病活性剤と共に、有効量の上記高純度サフィナミドを投与することによりパーキンソン病又は不穏下肢症候群を治療する段階を含む。

10

【0047】

更に、本発明の別の目的は慢性疼痛と神経因性疼痛を含む疼痛症状、偏頭痛、双極性障害、鬱病、心臓血管障害、炎症性障害、尿生殖器障害、代謝障害及び胃腸障害の治療として、前記治療を必要とする患者にジベンジル誘導体（IIb）又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩の含量が（「活性物質」に対して）0.03%未満、好ましくは0.01重量%未満である有効量の高純度ラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩を投与する段階を含む方法を提供することである。

20

【0048】

前記方法は治療を必要とする患者に場合によりガバペンチン又はプレガバリンと共に、高純度ラルフィナミド又は医薬的に許容可能な酸、好ましくはメタンスルホン酸とのその塩で慢性疼痛と神経因性疼痛を含む疼痛症状及び偏頭痛を治療する段階を含む。

【発明を実施するための形態】

【0049】

従来技術

WO90/14334及びPevarelloらの論文J. Med. Chem., 1998, 41, 579-590には、

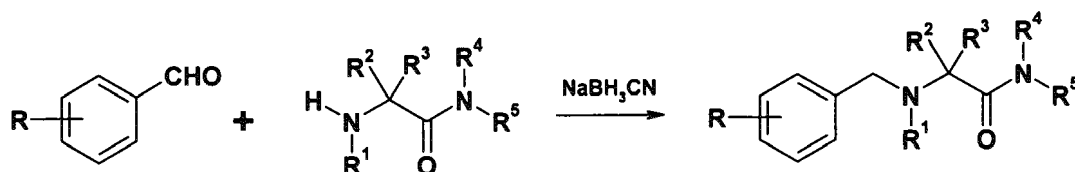
30

a) 対応する4-ヒドロキシベンズアルデヒドを適切な塩化ベンジルでO-ベンジル化することにより中間体4-ベンジルオキシベンズアルデヒドを合成する段階と、

b) 下式：

【0050】

【化3】



40

（式中、Rは特に3-F及び2-Fを表し；R¹は特に水素を表し；R²は特に水素を表し；R³は特にCH₃を表し；R⁴及びR⁵はいずれも特に水素を表す）に模式的に示すように、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを還元剤として使用して -アミノアミドを4-ベンジルオキシベンズアルデヒドで還元アルキル化する段階を含むベンジルオキシ-ベンジルアミノ-アルカンアミドの3段階製造法が記載されている。

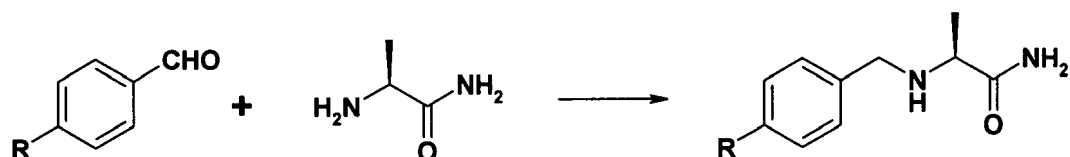
【0051】

特に、サフィナミド及びラルフィナミド製造に関する限り、還元アルキル化は下式：

【0052】

50

【化 4】



R = 3-F-ベンジルオキシ = サフィナミド (I a)

R = 2-F-ベンジルオキシ = ラルフィナミド (I b)

10

に示すようにそれぞれ 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド及び 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドによる L - アラニンアミドの還元アルキル化である。

【 0 0 5 3 】

J . Med . Chem . (P e v a r e l l o ら) , 1 9 9 8 , 4 1 , 5 7 9 - 5 9 0
には、対応する (フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドから出発してそれぞれサフィナミド及びラルフィナミドメタンスルホン酸塩を収率 4 5 % 及び 6 0 % で製造したことが報告されている。

【 0 0 5 4 】

W O 9 0 / 1 4 3 3 4 と及び上記論文に記載されている方法は同一であり、イミノアルキル化と還元を同一反応器で実施するワンポット系を提供している。L - アラニンアミド塩酸塩とシアノ水素化ホウ素ナトリウムとメタノールと粉末状モレキュラーシーブの混合物に適切なアルデヒドを一度に加えるものである。

20

【 0 0 5 5 】

(還元アルキル化による数種の - ベンジルアミノアミド誘導体の合成について記載している) P e v a r e l l o ら , O r g . P r e p . P r o c . I n t . 1 9 9 6 , 2 8 , 1 7 9 - 1 8 3 によると、イミニウムイオンはアルデヒドカルボニル基よりもシアノ水素化ホウ素ナトリウムと反応し易いので、対応するイミンの代わりにイミニウムイオンを形成するためには - アミノアミドを塩酸塩として使用することが重要である。

【 0 0 5 6 】

30

上記著者らによると、このワンポット法はシッフ塩基ラセミ化の問題がなくなると思われ、モレキュラーシーブにより反応速度が上げる (但し収率は低い) 。

【 0 0 5 7 】

シアノ水素化ホウ素ナトリウムしか還元剤として利用していないが、この選択はその反応性と選択性が低く (R e v i e w " S o d i u m C y a n o b o r o h y d r i d e - A H i g h l y S e l e c t i v e R e d u c i n g A g e n t f o r O r g a n i c F u n c t i o n a l G r o u p s " - C F . L a n e , S y n t h e s i s 1 9 7 5 , 1 3 2 - 1 4 6 参照) 、プロトン化シッフ塩基と出発材料であるアルデヒドを区別できないためであると思われる。

【 0 0 5 8 】

40

P e v a r e l l o らの論文に記載されている合成はカラムクロマトグラフィーにより生成物を単離した後、酸処理により対応する塩に変換する。サフィナミド及びラルフィナミドの両者及び / 又はそれらの塩のエナンチオマー及び / 又は化学純度に関する情報は全く提供されていない。

【 0 0 5 9 】

従来技術に記載されている方法はその大規模使用を制限する多数の欠点があり、以下にこれらの欠点の例をいくつか挙げる。

- シアン化物の形成 ;
- 活性成分から除去することが困難なボロン誘導体の形成 ;
- 物理的に変化し易く、高価な粉末状モレキュラーシーブの使用 ;

50

- 低収率；
- 還元アルキル化反応混合物中の終産物濃度が低い（約 2 ～ 3 重量 / 容量 %）；
- 化学合成による活性剤の大規模製造が必要な場合には煩雑で高価な精製法であるとみなされるカラムクロマトグラフィーにより生成物を単離している。

【 0 0 6 0 】

更に、下記実施例に示すように、従来技術に記載されている方法により得られた生成物はそれぞれの活性物質（Ⅰ a）、（Ⅰ b）、（Ⅰ c）又は（Ⅰ d）に対して 0 . 0 3 重量 % を上回る量の不純物（ⅠⅠ a）、（ⅠⅠ b）、（ⅠⅠ c）又は（ⅠⅠ d）を含有している。更に、溶媒からの結晶化やクロマトグラフィー等の広く知られている精製法はいずれの場合も収率低下を伴い、これらの方法を使用することにより終産物サフィナミド及びラ

10

【 0 0 6 1 】

4 - （フルオロベンジルオキシ）ベンズアルデヒド中間体の合成

公知方法によると、サフィナミド及びラフィナミドの合成中間体であるフルオロベンジルオキシベンズアルデヒドは塩基性媒体中で 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドのベンジル化により得られ、即ちアンビデント求核剤であるフェノール塩のベンジル化により得られ、所望 O - アルキル化誘導体と望ましくない C - アルキル化誘導体との 2 種類の異なる生成物が得られる。

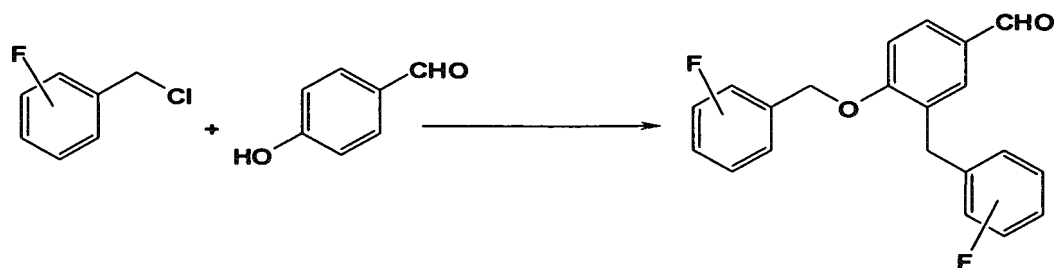
【 0 0 6 2 】

20

従来技術に従って 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドを 3 - フルオロベンジルクロリドでフルオロベンジル化すると、主生成物として 4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ）ベンズアルデヒド（Ⅰ V a）が得られると共に、4 - ヒドロキシベンズアルデヒドの 4 位ヒドロキシ基と 3 位炭素原子の両者のアルキル化に由来する 3 - （ 3 - フルオロベンジル） - 4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ）ベンズアルデヒド（Ⅴ a）も得られる。下記スキーム：

【 0 0 6 3 】

【 化 5 】



30

(IIIa₁): 3-F

(Va): 3-F

40

(IIIb₁): 2-F

(Vb): 2-F

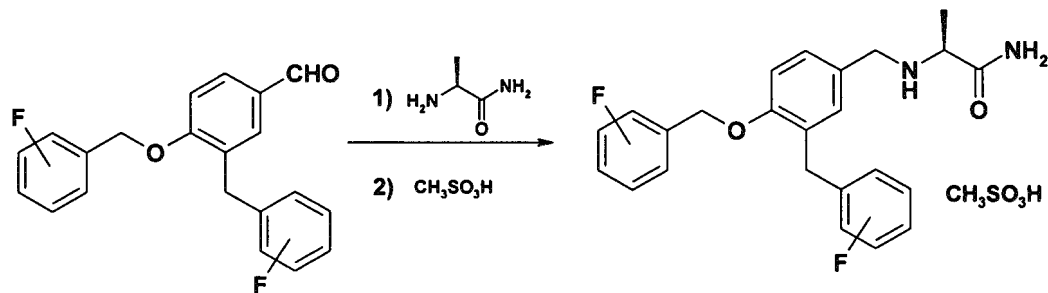
に従って 4 - ヒドロキシベンズアルデヒドを 2 - フルオロベンジルクロリドでフルオロベンジル化する場合も同様である。

【 0 0 6 4 】

下記スキーム：

【 0 0 6 5 】

【化 6】



(Va): 3-F

(IIc): 3-F

(Vb): 2-F

(IId): 2-F

に示すように、ジアルキル化不純物を含有するアルデヒドで L - アラニンアミドを還元アルキル化すると、遊離塩基 (IIa) 又は (IIb) にせよ、好ましくはメタンスルホン酸との塩形成化合物 (IIc) 又は (IId) にせよ、同様にジベンジル誘導体であるそれぞれのジアルキル化物で汚染されたサフィナミド又はラルフィナミド終産物が得られる。

【0066】

メタンスルホン酸が好ましいが、他の医薬的に許容可能な酸 (例えば硝酸、塩酸、臭化水素酸、硫酸、過塩素酸、リン酸、メタンスルホン酸、p - トルエンスルホン酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、乳酸、蔞酸、マロン酸、リンゴ酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸、安息香酸、桂皮酸、マンデル酸及びサリチル酸) も使用できる。

【0067】

モノアルキル化誘導体 (サフィナミド又はラルフィナミド) 及び対応するジアルキル化不純物は類似する化学的・物理的性質をもつため、サフィナミド及びラルフィナミドを従来の方法で精製するのは難しい。

【0068】

更に、公知方法にはその他に以下の欠点もある。

1) 溶媒として低級アルコールを使用するため、塩基性条件下で溶媒 (例えばメタノール) はそれ自体が求核試薬として作用し、3 - 又は 2 - フルオロベンジルクロリドと共に所定量のメチルフルオロベンジリエーテルを生じる可能性がある；

2) アルコール性反応溶媒を反応混合物から除去した後には終産物を水不混和性有機溶媒で抽出することができない。

【0069】

上記従来技術の方法を使用することにより、それぞれの不純物 (IIa) 又は (IIb) の含量が 0.03 (重量) % 未満である式 (Ia) 又は (Ib) の終産物を得るためには、式 (Va) 及び (Vb) のそれぞれの不純物含量を低減するように中間体 4 - (3 - フルオロベンジロキシ) ベンズアルデヒド (IVa) 又は 4 - (2 - フルオロベンジロキシ) ベンズアルデヒド (IVb) を徹底的に精製する必要があることが今回判明した。前記精製は反応生成物を結晶化することにより実施すること好ましく、粗化合物 (IVa) 又は (IVb) の不活性有機溶媒溶液に混和性不活性有機非溶媒を加えることにより実施することがより好ましい。不活性有機溶媒は芳香族炭化水素から選択することが好ましく、トルエンがより好ましい。混和性不活性有機非溶媒は低級脂肪族炭化水素から選択することが好ましく、n - ヘキサンがより好ましい。別の結晶化法としては、上記化合物 (IVa) 又は (IVb) を高温溶媒 (例えば還流下のシクロヘキサン又はジ (C₃ - C₄) アルキルエーテル、例えばジイソプロピルエーテル) に溶かした後、溶液を室温、好ましくは 10 ~ 15 °C に冷却する方法が挙げられ、純化合物 (IVa) 又は (IVb) の

10

20

30

40

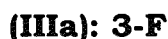
50

【 0 0 7 0 】

【 0 0 7 1 】

【化 7】

10



(IVa): 3-F

(IIIb): 2-F

(IVb): 2-F

【 0 0 7 2 】

20

【 0 0 7 3 】

【 0 0 7 4 】

30

【 0 0 7 5 】

【 0 0 7 6 】

40

【 0 0 7 7 】

【 0 0 7 8 】

50

ドの比は 0.6 ~ 1.5 であり、0.9 ~ 1.1 が好ましい。

【0079】

反応温度は 60 ~ 160 であり、80 ~ 120 が好ましい。

【0080】

反応時間は一般に 4 ~ 8 時間とする。

【0081】

反応収率は非常に高く、一般に 90 % を上回る。

【0082】

上記反応条件下で反応生産性即ち反応混合物中の反応生成物の濃度は非常に高く、一般に 25 (重量/容量) % 以上である。

10

【0083】

- アミノアミドの還元アルキル化によるサフィナミド及びラルフィナミドの合成

現状技術に鑑みると、水素と不均一触媒を還元剤として使用して - アミノアミドを 4 - (3 - 又は 2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドで還元アルキル化するのは試薬と終産物と還元条件の不適合性によりサフィナミド及びラルフィナミドの製造に適していないことが当業者に予想されよう。

【0084】

実際に、ベンズアルデヒドが容易にベンジルアルコールに還元され、あるいは対応する炭化水素にも容易に還元されることは周知であり、ベンジル炭素原子と窒素や酸素等のヘテロ原子の結合はサフィナミド及びラルフィナミドの両者とそれらの前駆体に存在する種類の結合であるが、水素と不均一触媒による還元アルキル化を実施するために使用すべき条件がこのような結合を破壊するために使用される条件と一般に同一であることも知られている。

20

【0085】

実際に、ベンジル基は導入し易く、接触還元法により除去できるため、フェノール又はアミンの保護基として一般に使用されている (“Protective Groups in Organic Synthesis”, T. W. Greene and P. G. M. Wuts, 3rd Edition, 1999, John Wiley & Sons, Inc. 参照)。

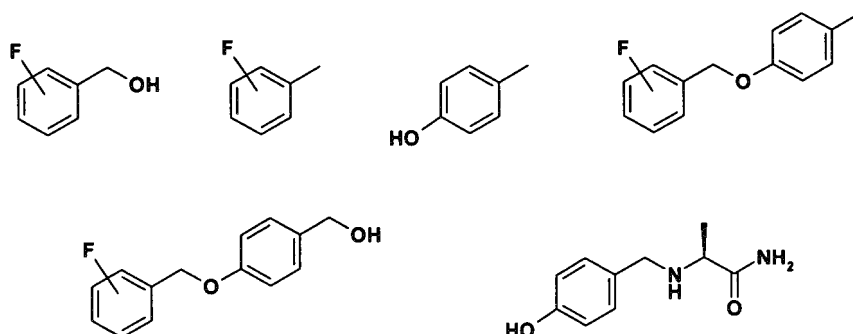
【0086】

サフィナミド及びラルフィナミドを得るための還元アルキル化では、多くの副生物が形成されると予想されるが、そのいくつかを以下に挙げる。

30

【0087】

【化 8】



40

【0088】

水素と不均一触媒を還元系として使用して L - アラニンアミドを 4 - (3 - 又は 2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドで還元アルキル化することにより非常に高い収率と純度でサフィナミド及びラルフィナミドが得られたという事実はこの合成法の予想外の革新的側面である。

【0089】

50

更に、この方法により使用される反応条件は大規模生産に容易に適用可能である。

【0090】

本発明の目的である還元アルキル化は、

- a) シッフ塩基の形成と、
 - b) シッフ塩基の接触還元
- の2段階で実施される。

【0091】

これらの2段階はシッフ塩基の単離を伴うか又は伴わずにいずれの場合も高収率で同一反応器で連続的に実施することができる(ワンポット反応)。

【0092】

シッフ塩基を単離する場合には、その形成に適用される実験条件により、単離されたシッフ塩基を高収率で非常に純粋な形態の沈殿として得ることができる。

【0093】

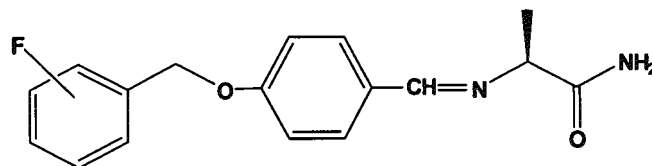
シッフ塩基製造は試薬と生成物に対して不活性であると同時にイミン二重結合の還元条件に対して不活性なプロトン性有機溶媒中で実施すると適切であり、このような溶媒としては例えば(C₁ - C₅)低級アルカノールが挙げられ、メタノール、エタノール及びイソプロパノールが好ましい。

【0094】

シッフ塩基の形成は完了する必要があるが、これはその後の接触還元段階で高収率を得るための関連要因である。従って、イミン二重結合の還元を実施する前にシッフ塩基(VI a)及び(VI b)を還元することが好ましい。

【0095】

【化9】



(VIa):3-F

(VIb):2-F

【0096】

単離されたイミノ化合物(VI a)及び(VI b)は本発明によるそれぞれサフィナミド及びラルフィナミドの製造に有用な中間体である。

【0097】

あるいは、イミノ化合物(VI a)及び(VI b)の沈殿を生じると共に中間体イミノ誘導体を含む懸濁液を接触還元するような条件下で操作することによりイミノアルキル化反応完了を助長することもできる。

【0098】

L-アラニンアミド(塩基又は塩)と4-(3-又は2-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドの比は1:1とすることができるが、10%過剰のL-アラニンアミドを使用すると有利な場合もある。

【0099】

L-アラニンアミドは遊離塩基又はその酸付加塩として導入することができる。塩として反応混合物に導入することが好ましく、化学量論的量の塩基、好ましくは例えばトリエチルアミンやジイソプロピルエチルアミン等の第3級アミンと共に塩酸塩として導入することが最も好ましい。

【0100】

シッフ塩基の製造における反応温度は0 ~ 60、好ましくは20 ~ 30である。

10

20

30

40

50

【0101】

反応時間は1時間～15時間、好ましくは4時間～6時間である。

【0102】

水素と不均一触媒によるシッフ塩基の還元はシッフ塩基形成が完了しないと開始せず、完了前に開始するならば、二次反応が増加し、場合によっては優勢になり、収率と純度が低下する。これらの二次反応の1つは増加するにつれて選択（フルオロベンジルオキシ）ベンズアルデヒドのカルボニル基の還元によりベンジルアルコールの形成をもたらす。

【0103】

好ましい不均一触媒は例えば炭素、アルミナ及びシリカ等の不活性担体、好ましくは炭素及びアルミナに担持したニッケル、ロジウム、パラジウム又は白金触媒であり、4 - (3 - 又は2 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドの2%～20%、好ましくは5%～10%の量を使用する。白金及びパラジウム触媒が最も好ましい。

10

【0104】

特に活性炭に担持した白金はベンジル炭素原子とヘテロ原子間の結合を変化させずにイミン二重結合のみを還元するのでほぼ定量的な収率と選択性の両面で優れた結果が得られる。サフィナミド及びラルフィナミドは還元反応条件下で意外にも安定であることが判明したが、偶発的に反応時間が延びても終産物を損なうことがなくなるので、これは大量のサフィナミド又はラルフィナミドの工業生産に重要な要素である。

【0105】

含水5%Pt/C(50% H_2O)、特にEngelhard S.r.l., Rome, Italyの製品である炭素粉末担持5%Ptで最良の結果が得られた。

20

【0106】

水素化反応は通常1パール～10パール、好ましくは3パール～6パールの水素圧下に10～70、好ましくは25～40の温度で実施される。

【0107】

還元時間は温度、圧力、濃度、乱流等の当業者に周知の全因子に応じて1時間～20時間とすることができる。

【0108】

4～6時間の反応時間で最良の結果が得られた。

【0109】

30

反応終了後、触媒を濾過により回収し、再利用又は再生し、反応溶媒を減圧蒸留し、残渣を水不混和性有機溶媒に溶かし、無機塩を水洗により除去する。

【0110】

サフィナミド又はラルフィナミドを溶解している有機溶媒を留去することにより粗終産物サフィナミド又はラルフィナミドを回収する。

【0111】

次に粗サフィナミド又はラルフィナミドを結晶化により精製する。結晶化は式(Ia)又は(Ib)のそれぞれの粗化合物の不活性有機溶媒溶液に混和性不活性有機非溶媒を加えることにより実施することが好ましい。不活性有機溶媒はベンゼン、トルエン、ジメチルベンゼン及びエチルベンゼン等の芳香族炭化水素と低級アルキル酢酸塩から選択することが好ましく、酢酸エチルがより好ましい。混和性不活性有機非溶媒はヘキサンやヘプタン等の低級脂肪族炭化水素とシクロヘキサンから選択することが好ましく、n-ヘキサンがより好ましい。

40

【0112】

次に公知方法により塩基を所望塩に変換し、特に医薬用医薬製剤へのその後の製剤化に適した物理的/化学的性質(安定性、粒度、流動性等)をもつメタンスルホン酸塩に変換する。

【実施例1】

【0113】

相間移動触媒反応による精製4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(

50

I V b) の製造

2 - フルオロベンジルクロリド (5 kg, 34.58 mol) と 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (3.9 kg, 31.94 mol) と炭酸カリウム (4.3 kg, 31.11 mol) とテトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド (0.41 kg, 1.22 mol) をトルエン (9.5 kg) に加えた混合物を窒素下で撹拌しながら還流温度までゆっくりと加熱し、6 時間還流する。

【0114】

次に溶液を室圧で濃縮し、トルエン 3 kg を加えて留去し、この手順をもう一度繰返す。

【0115】

次に不均一混合物を室温まで冷却し、固形分を濾別する。次に残留溶媒を減圧除去し、油性残渣にトルエン 1.2 kg を加える。混合物を約 40 まで加熱し、純 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド数グラムをシード添加する。

【0116】

不均一混合物を 35 ~ 40 で 15 分間撹拌した後、この温度で 30 分間 n - ヘキサン (9 kg) を加える。0 ~ 5 まで冷却し、この温度で更に 1 時間撹拌後、固形分を濾取し、減圧乾燥し、m.p. 56.7 (DSC, 5 / 分) の 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド 6.5 kg (87.6 % 収率) を得る。

【0117】

4 - ヒドロキシベンズアルデヒド 39 g (0.319 mol) を出発材料として使用し、反応溶媒の除去と油性残渣へのトルエン添加後に、得られた混合物を (40 でなく) 約 30 ~ 35 まで加熱し、少量の純 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドのシード添加後に不均一混合物を (35 ~ 40 でなく) 30 で 15 分間撹拌した後に n - ヘキサンを加える以外は上記手順に従うことにより、上記反応を 100 分の 1 の規模で繰返す。

【0118】

m.p. 56.7 (DSC, 5 / 分)、GC 純度 92.2 (面積%, 実施例 16 A 参照) 及び GC (実施例 16 B 参照) により測定した 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド含量が 0.01 重量% の 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド 66.8 g (90 %) が得られる。

【0119】

(*) 本実施例及び以下の実施例で報告する収率は特に指定しない限り、モル収率である。

【0120】

1.1 結晶化による 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドの更なる精製

実施例 1 に記載した手順に従って製造した生成物 1 kg を還流撹拌下にジイソプロピルエーテル 2 kg に溶かす。

【0121】

溶液を 10 ~ 15 分間で 50 ~ 55 まで冷却し、純 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド数グラムをシード添加する。

【0122】

懸濁液を 45 ~ 60 分間で 10 ~ 15 まで冷却し、更に 1 時間撹拌する。

【0123】

最後に沈殿を濾取し、冷ジイソプロピルエーテル (0.2 kg) で洗浄し、減圧乾燥し、GC 純度 99.8 (面積%, 実施例 16 A 参照) 及び実施例 16 B に従って GC により測定した 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (V b) 含量が 0.005 重量% の 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド 0.93 kg を得る。

【0124】

10

20

30

40

50

1.2 各種触媒を使用した相間移動触媒反応 (P T C) による 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V b) の製造

3 種類の異なる相間移動触媒を使用した以外は実施例 1 と同一手順に従い、4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (0.39 g) を 2 - フルオロベンジルクロリドでアルキル化することにより 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを製造する。

【0125】

結果を下表 4 に報告する。

【0126】

【表 5】

表 4

実験	相間移動触媒PCT	%Vb**	%収率
1.2(a)	テトラブチルホスホニウムブロミド	0.03	85.0
1.2(b)	Aliquat 336*	0.03	88.8
1.2(c)	PEG 400	0.14	96.0

* Aliquat 336: トリカブチルメチルアンモニウムクロリド

** %Vb: 3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドの含量(重量%)

Vb含量は実施例16Bに従い、GCにより測定した。

【0127】

1.3 キシレン中の相間移動触媒反応 (P T C) による 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V b) の製造

トルエンの代わりにキシレンを溶媒として使用した以外は実施例 1 と同一手順に従って 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (0.39 g) を 2 - フルオロベンジルクロリドと反応させることにより、G C (実施例 16 B 参照) により測定した 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド含量が 0.02 重量%の 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを 86.6 % 収率で製造する。

【0128】

1.4 水酸化カリウムを塩基として使用した相間移動触媒反応による 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V b) の製造

炭酸カリウムの代わりに水酸化カリウム (0.35 mol) を使用した以外は実施例 1 と同一手順に従って 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (0.39 g) を 2 - フルオロベンジルクロリドと反応させることにより、G C (実施例 16 B 参照) により測定した 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド含量が 0.51 重量%の 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを 86.7 % 収率で製造する。

【0129】

この生成物を実施例 1.1 に従って結晶化により更に精製することができる。

【0130】

1.5 2 - フルオロベンジルブロミドを使用した相間移動触媒反応による 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V b) の製造

実施例 1 と同一手順に従って 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (15.6 g) を 2 - フルオロベンジルクロリドの代わりに 2 - フルオロベンジルブロミドと反応させることにより、G C (実施例 16 B 参照) により測定した 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド含量が 0.07 重量%の 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを 88.6 % 収率で製造する。

【実施例 2】

【0131】

高純度 (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパン

10

20

30

40

50

アミド（ラルフィナミド，I b）の製造（ワンポット反応）

実施例 1 に従って製造する 4 - （2 - フルオロベンジルオキシ）ベンズアルデヒド（2 . 0 k g , 8 . 6 9 m o l）をオートクレーブに仕込んだ後、L - アラニンアミド塩酸塩（1 . 2 k g , 9 . 6 3 m o l）とトリエチルアミン（0 . 9 7 k g , 9 . 6 3 m o l）のメタノール（9 . 5 k g）溶液を加える。

【0132】

混合物を 20 ~ 25 で約 1 時間攪拌する後、(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ)ベンジリデンアミノ]プロパンアミド数グラムをシード添加後に攪拌を更に 15 分間続ける。次に不均一混合物に攪拌下にメタノール（1 . 6 k g）と含水（50 % H₂O）Pt / C 5 %（Engelhardt cod. Escat 22, Engelhardt S. r. l., Rome, Italy）（0 . 28 k g）を 20 ~ 25 で加える。

10

【0133】

オートクレーブから空気を窒素パージした後、水素を 5 . 0 バールで導入し、水素化工程中、圧力をこの値に維持する。

【0134】

30 ~ 35 で 5 時間後に、反応混合物を 15 まで冷却し、メタノール（4 . 8 k g）を加えて 40 ~ 45 まで加熱後、懸濁液を濾過し、固形分をメタノール（1 . 6 k g）で洗浄する。

【0135】

20

溶媒を約 30 で減圧除去し、水添加は発熱プロセスなので冷却下に攪拌しながら 20 ~ 25 で残渣に水（5 L）を加える。不均一混合物を更に 15 ~ 20 まで冷却し、この温度に 1 時間維持する後、濾過する。固形分を集めて冷水（4 L）で洗浄し、減圧乾燥し、実施例 17 A の方法に従って測定した HPLC 純度が 98 . 8（面積 %）であり、実施例 17 B の方法に従って HPLC により測定した C，O - ジアルキル化 (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド含量が 0 . 01 重量 % のラルフィナミド 2 . 23 k g（85 . 0 % 収率）を得る。

【0136】

2 . 1 パラジウム触媒の使用による高純度 (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド (I b) の製造

30

含水（50 % H₂O）Pt / C 5 % の代わりに含水（50 % H₂O）Pd / C 10 % を使用した以外は実施例 2 と同一手順に従い、実施例 1 に従って製造する 4 - （2 - フルオロベンジルオキシ）ベンズアルデヒド 5 g と対応量の L - アラニンアミド塩酸塩及びトリエチルアミンの混合物を水素化し、(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド (I b) を 70 % 収率で得る。

【実施例 3】

【0137】

高純度 (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩（ラルフィナミドメタンスルホン酸塩，I d）の製造

40

実施例 2 に記載したように製造するラルフィナミド（2 . 8 k g , 9 . 26 m o l）をイソプロパノール（19 . 5 k g）に溶かし、不活性雰囲気下で攪拌下に 65 ~ 70 に維持する。

【0138】

活性炭（150 g）処理と濾過後に、溶液に純ラルフィナミドメタンスルホン酸塩をシード添加し、50 ~ 55 の温度で攪拌下にメタンスルホン酸（900 g , 9 . 36 m o l）を 30 分間加える。次に懸濁液を 2 時間で 15 ~ 20 まで冷却し、攪拌を更に 1 時間続ける。最後に固形分を濾取し、減圧乾燥し、ラルフィナミドメタンスルホン酸塩 3 . 59 k g（97 . 3 % 収率）を得る。

【0139】

50

得られた生成物のHPLC純度は99.8(面積%,実施例17A参照)であり、C, O-ジアルキル化(S)-2-[3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩含量は0.005重量%(実施例17B参照)であり、DSC(5/分)によるm.p.240.6である。

【0140】

キラルHPLCカラムで測定したラルフィナミドメタンスルホン酸塩のエナンチオマー純度は99.8(面積%,実施例18参照)である。

【実施例4】

【0141】

10

エタノール溶液中の精製4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(IVa)の製造

4-ヒドロキシベンズアルデヒド(1.52kg, 12.45mol)と炭酸カリウム(1.72kg, 12.45mol)とヨウ化カリウム(0.2kg, 1.20mol)をエタノール(13.0kg)に加える混合物に、室温で攪拌下に3-フルオロベンジルクロリド(1.80kg, 12.45mol)1.8kgを加える。

【0142】

混合物を徐々に還流温度まで加熱した後、この温度に6時間維持する。

【0143】

次に反応混合物を25℃まで放冷させ、懸濁液を濾過し、固形分をエタノール(1.0kg)で洗浄し、エタノール溶液を合わせた後、約3.5kgの残渣が得られるまで減圧濃縮する。

20

【0144】

この残渣にトルエン(5.0kg)と水(1.7kg)を加え、溶媒混合物を30分間激しく攪拌し、水相の分離後、有機層を減圧蒸発乾涸し、粗4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドを得る。

【0145】

この生成物をトルエン2kgに溶かし、20~25℃で攪拌下に4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドをシード添加した後、n-ヘキサン(3.8kg)を30分間加え、混合物を攪拌下に0℃まで冷却する。

30

【0146】

2時間後に固形分を濾過し、n-ヘキサン(1.3kg)で洗浄する。乾燥後に、ガスクロマトグラフィー純度99.9(面積%,実施例16A参照)、G.C.(面積%,実施例16B参照)により測定した3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド含量0.005重量%、及びDSC 5/分によるm.p.43.1の所望生成物2.6kg(90.7%収率)が得られる。

【実施例5】

【0147】

相間移動触媒反応による4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(IVa)の製造

40

3-フルオロベンジルクロリド(5kg, 34.58mol)と4-ヒドロキシベンズアルデヒド(3.9kg, 31.94mol)と炭酸カリウム(4.3kg, 31.11mol)とテトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド(0.41kg, 1.22mol)をトルエン(13.5kg)に加える混合物を窒素雰囲気下で攪拌下に還流温度までゆっくりと加熱し、6時間還流する。

【0148】

溶液を室圧で濃縮する後、トルエン3kgを加えて留去する。この手順をもう一度繰返す。

【0149】

次に不均一混合物を室温まで冷却し、固形分を濾別する。残留溶媒を減圧除去し、油性

50

残渣にトルエン 1.2 kg を加える。混合物を 20 ~ 25 で攪拌し、純 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド数グラムをシード添加する後、この温度で 30 分間 n - ヘキサン (9 kg) を加える。

【0150】

0 ~ 5 まで冷却し、この温度で更に 1 時間攪拌後、固形分を濾取し、減圧乾燥し、GC 純度 99.9 (面積%, 実施例 16 A 参照) 及び 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド含量 0.008 重量% (実施例 16 B 参照) の生成物 6.5 kg (85% 収率) を得る。

【0151】

5.1 結晶化による 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド (IV a) の更なる精製 10

実施例 5 に従って製造する 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド 1 kg を還流攪拌下にジイソプロピルエーテル 2 kg に溶かす。

【0152】

溶液を 10 ~ 15 分間で 50 ~ 55 まで冷却し、純 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド数グラムをシード添加する。

【0153】

懸濁液を 45 ~ 60 分間で 10 ~ 15 まで冷却し、更に 1 時間攪拌する。

【0154】

最後に沈殿を濾取し、冷ジイソプロピルエーテル (0.2 kg) で洗浄し、減圧乾燥し、GC 純度 99.9 (面積%, 実施例 16 A 参照) 及び GC (実施例 16 B 参照) により測定した 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド含量が 0.005 重量% 未満の 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド 0.95 kg を得る。 20

【0155】

5.2 3 - フルオロベンジルブロミドを使用した相間移動触媒反応による 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド (IV a) の製造

3 - フルオロベンジルクロリドの代わりに 3 - フルオロベンジルブロミドを使用した以外は実施例 5 と同一手順に従って 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (15.6 g) を 3 - フルオロベンジルブロミドと反応させることにより、GC (実施例 16 B 参照) により測定した 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド含量が 0.07 重量% の 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドを 86.1% 収率で製造する。 30

【0156】

こうして得られた 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドを実施例 5.1 に従って精製し、GC (実施例 16 B 参照) により測定した 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド含量が 0.07 重量% の標記生成物を 97.3% 収率で得る。

【0157】

5.3 3 - フルオロベンジルメタンスルホネートを使用した相間移動触媒反応による 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド (IV a) の製造 40

実施例 5 と同一手順に従い、4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (15.6 g) を 3 - フルオロベンジルクロリドの代わりに 3 - フルオロベンジルメタンスルホネートと反応させることにより、GC (実施例 16 B 参照) により測定した 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド含量が 0.45 重量% の 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドを 97.5% 収率で製造する。実施例 5.1 の手順に従い、この生成物を更に精製する。

【実施例 6】

【0158】

高純度 (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパン 50

アミド(サフィナミド, I a)の製造(ワンポット反応)

実施例4に記載したように製造する4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(2.0 kg, 8.69 mol)をオートクレーブに仕込んだ後、L-アラニンアミド塩酸塩(1.2 kg, 9.63 mol)とトリエチルアミン(0.97 kg, 9.63 mol)のメタノール(7.1 kg)溶液を加える。

【0159】

混合物を20~25℃で1時間攪拌した後、(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド数グラムをシード添加後に攪拌を更に15分間続ける。次に不均一混合物に攪拌下にメタノール(1.8 kg)と含水(50% H₂O) Pt/C 5% (Engelhard cod. Escat 22)(0.3 kg)を20~25℃で加える。

10

【0160】

オートクレーブから空気を窒素パージした後、水素を5.0バールで導入する。

【0161】

30~35℃で5時間後に、混合物を15℃まで冷却し、メタノール(4.8 kg)を加え、混合物を40~45℃まで加熱し、最後に固形分を濾別し、メタノール(1.6 kg)で洗浄する。

【0162】

溶媒を約30℃で減圧除去した後、酢酸エチル(23.0 kg)と水(18.0 kg)の混合物を残渣に加える。15分間攪拌後、水相を分離し、酢酸エチル(7.0 kg)で抽出した。有機相を集め、約6.0 kgの残渣が得られるまで濃縮する。この残渣にn-ヘプタン(10.8 kg)を加え、混合物を20℃で約2時間攪拌する。次に固形分を濾取し、n-ヘプタンで洗浄する。

20

【0163】

固形分を減圧乾燥後、HPLC純度98.4(面積%, 実施例17A参照)及びC, O-ジベンジル化(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド)含量0.005重量%(実施例17B参照)の標記化合物2.41 kg(91.8%収率)が得られる。

【0164】

6.1 Pd触媒の使用による高純度(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(I a)の製造

30

含水(50% H₂O) Pt/C 5%の代わりに含水(50% H₂O) Pd/C 10%を使用することにより、実施例6と同一手順に従って(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(5 g)を対応量のL-アラニンアミド塩酸塩とトリエチルアミンの存在下で水素化し、I aを72%収率で製造する。

【0165】

6.2 1バールの水素化による高純度(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(I a)の製造

5バール/H₂の代わりに1バール/H₂とした以外は実施例6と同一手順に従って(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドとL-アラニンアミド塩酸塩とトリエチルアミンの混合物を水素化する。

40

【0166】

HPLC純度98.7(面積%, 実施例17A参照)及びHPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド含量が0.005重量%の(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドが収率90%で得られる。

【0167】

6.3 L-アラニンアミド塩基の使用による高純度(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(I a)の製造(ワンポット反応)

50

L - アラニンアミド塩酸塩の代わりに L - アラニンアミド塩基とトリエチルアミンを使用した以外は実施例 6 と同一手順に従って (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (10 g) を反応させる。HPLC 純度 99.7 (面積%, 実施例 17A 参照) 及び HPLC (実施例 17B 参照) により測定した (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド含量が 0.005 重量%未満の (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドが収率 92% で得られる。

【実施例 7】

【0168】

高純度 (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩 (サフィナミドメタンスルホン酸塩, Ic) の製造

実施例 6 に記載したように製造 サフィナミド (2.41 kg, 7.97 mol) を 65 の酢酸エチル (56.5 kg) に溶かし、活性炭 (100 g) で脱色する。

【0169】

濾過後、溶液を攪拌し、サフィナミドメタンスルホン酸塩数グラムをシード添加し、15 分後にメタンスルホン酸 (850 g, 8.84 mol) を温度 50 ~ 55 で 30 分間加える。懸濁液を 2 時間攪拌下に 20 ~ 25 まで冷却し、更に 1 時間攪拌する。最後に沈殿を濾取し、減圧乾燥し、サフィナミドメタンスルホン酸塩 2.83 kg (89.1% 収率) を得る。

【0170】

HPLC (実施例 17B 参照) により測定した不純物 (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩 (IIc) の含量は 0.005 重量%である。標記化合物は DSC (5 / 分) による m.p. 216.8 である。

【0171】

キラル HPLC カラムにより測定したエナンチオマー純度は 99.9 (面積%, 実施例 19 参照) を上回る。

【0172】

¹H - NMR (D₂O) (Bruker AV300) (4.7 ppm の H₂O に対する ppm) : 1.43 (3H, d, J = 7 Hz, CH₃) ; 2.66 (3H, s, CH₃SO₃H) ; 3.87 (1H, q, J = 7 Hz, H-2) ; 3.97 (2H, bs, CH₂NR) ; 4.89 (2H, s, CH₂OR) ; 6.88 及び 7.23 (4H, AA'XX' 芳香族 p - ジ置換系) ; 6.90 - 7.22 (4H, 芳香族 H)。

【0173】

¹³C - NMR (D₂O) (Bruker AV300) ppm : 15.68 (CH₃) ; 38.27 (CH₃SO₃H) ; 48.99 (CH₂NR) ; 54.81 (CH) ; 69.00 (OCH₂) ; 114.15 (d, J_{C-F} = 21 Hz, 芳香族 CH) ; 114.76 (d, J_{C-F} = 20 Hz, 芳香族 CH) ; 115.38 (芳香族 CH) ; 123.06 (d, J_{C-F} = 24 Hz, 芳香族 CH) ; 123.24 ; 130.29 (d, J_{C-F} = 6 Hz, 芳香族 CH) ; 131.54 (芳香族 CH) ; 138.76 (d, J_{C-F} = 7 Hz, 芳香族 CH) ; 158.52 ; 162.89 (d, J_{C-F} = 24.5 Hz, C-F) ; 171.92 (CO)。

【実施例 8】

【0174】

中間体シッフ塩基 (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジリデンアミノ] プロパンアミド (Via) の単離を伴う高純度 (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (サフィナミド, Ia) の製造

a) (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジリデンアミノ] プロパンアミド (Via)

実施例 5 に記載したように製造する 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデ

10

20

30

40

50

ヒド (60.0 g, 0.26 mol) と L-アラニンアミド塩酸塩 (35.7 g, 0.29 mol) のメタノール (280 mL) 懸濁液に窒素雰囲気下で室温にて攪拌下にトリエチルアミン (29.1 g, 0.29 mol) を加える。攪拌を更に 1 時間続ける。

【0175】

次に溶液に (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジリデンアミノ] プロパンアミド数グラムをシード添加し、温度を 5 ~ 10 まで下げ、攪拌を 2 時間続ける。

【0176】

固形分を濾取し、0 のメタノールで洗浄する。

【0177】

減圧乾燥後、DSC (5 / 分) による m.p. 112.0 の標記化合物 57.3 g (73.2 % 収率) が得られる。

【0178】

¹H-NMR (DMSO-d₆) (Bruker AV300) (2.55 ppm の TMS; 3.35 ppm の DMSO 溶媒に対する ppm): 1.31 (3H, d, J = 7 Hz, CH₃); 3.86 (1H, q, J = 7 Hz, H-2); 5.18 (2H, s, CH₂OR); 7.08 及び 7.79 (4H, AA'XX' p-ジ置換芳香族系); 7.10 - 7.50 (4H, m, 芳香族 H); 8.27 (1H, s, CH=NR)。

【0179】

¹³C-NMR (DMSO-d₆) (Bruker AV300) (ppm): 20.5 (CH₃); 67.6 (CH); 68.4 (OCH₂); 114.1 及び 114.4 (d, J_{C-F} = 21 Hz, 芳香族 CH); 114.5 及び 114.8 (d, J_{C-F} = 21 Hz, 芳香族 CH); 114.8 (芳香族 CH); 123.5 (d, J_{C-F} = 2 Hz, 芳香族 CH); 129.0 及び 129.9 (芳香族 CH); 130.4 及び 130.5 (d, J_{C-F} = 7 Hz, 芳香族 CH); 139.6 及び 139.7 (d, J_{C-F} = 6 Hz, 四重線芳香族 C); 160.2; 160.5 及び 163.8 (d, J_{C-F} = 24.5 Hz, C-F); 160.6 (CH=N); 174.8 (CO)。

【0180】

b) (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (Ia)

上記のように製造する (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジリデンアミノ] プロパンアミド (16.0 g; 0.053 mol) と含水 (50% H₂O) Pt/C 5% (1.7 kg; Engelhard S.r.l., Rome, Italy) をオートクレーブに仕込み、メタノール (90 mL) を加える。オートクレーブから空気を窒素パージした後、水素を 5.0 バールで導入する。反応を 5.0 バールで 35 に 1 時間維持する。室温まで冷却して触媒を濾別後、約 30 g の残渣が得られるまで溶媒を減圧留去する。この残渣に酢酸エチル (150 mL) と H₂O (110 mL) の混合物を加え、明白な 2 相が得られるまで不均一混合物を 40 まで加熱する。これらの 2 相を分離し、水層を 40 で酢酸エチル 50 mL で抽出する。有機相を集め、蒸発乾涸する。酢酸エチルを 90 mL ずつ加えることによりこの手順を 2 回繰返し、生成物を無水物にする。次に n-ヘプタン 95 mL を攪拌下に残渣にゆっくりと加える。次に混合物を 20 で 3 時間攪拌下に維持する。形成された固形分を濾取し、n-ヘプタン (15 mL) で洗浄し、減圧乾燥し、HPLC 純度 99.8 (面積%, 実施例 17A 参照) 及び HPLC (実施例 17B 参照) により測定した (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド含量が 0.005 重量% 未満のサフィナミド 15.2 g (94.8 % 収率) を得る。

【実施例 9】

【0181】

中間体 Schiff 塩基 (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジリデンアミノ] プロパンアミド (VIb) の単離を伴う高純度 (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロ

10

20

30

40

50

ベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (ラルフィナミド, I b) の製造

【0182】

a) (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジリデンアミノ] プロパンアミド (V I b)

4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドの代わりに4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを使用した以外は実施例 8, ステップ a) と同一手順に従い、(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジリデンアミノ] プロパンアミドを 88% 収率, m. p. 121 (キャピラリー) で製造する。

【0183】

¹H - NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) (TMS に対する ppm) : 1.46 (3H, d, J = 7.0 Hz, CH₃); 3.91 (1H, q, J = 7.0 Hz, CH - CO); 5.17 (2H, s, O - CH₂); 7.02 (2H, d, J = 8.9 Hz, O - CH₂ に対してオルト位の芳香族 H); 7.09 (1H, ddd, J_{H - F} = 9.78 Hz, J_{ortho} = 8.55 Hz, J_{meta} = 1.23 Hz, F に対してオルト位の芳香族 H); 7.15 (1H, dt, J_{ortho} = 7.35 Hz, J_{meta} = 1.23 Hz, F に対してパラ位の芳香族 H); 7.27 - 7.40 (1H, m, CH₂ に対してパラ位の芳香族 H); 7.48 (1H, dt, J_{ortho} = J_{H - F} = 7.35 Hz, J_{meta} = 1.53 Hz, CH₂ に対してオルト位の芳香族 H); 7.71 (2H, d, J = 8.9 Hz, CH = N に対してオルト位の芳香族 H); 8.17 (1H, s, C = N)。

【0184】

¹³C - NMR: (CDCl₃, 75.4 MHz, 298 K) (ppm): 21.4 (CH₃); 63.8 (OCH₂); 68.4 (H₂NC OCH); 115.0 (d, J_{C - F} = 22.4 Hz, 芳香族 CH), 115.5 (d, J_{C - F} = 20.7 Hz, 芳香族 CH); 123.7 (d, J_{C - F} = 14.4 Hz, 四重線芳香族 C); 124.5 (bd, 芳香族 CH); 129.0 (四重線芳香族 C); 129.8 (bd, 芳香族 CH); 130.1 (bd, 2 芳香族 CH); 160.5 (d, J_{C - F} = 246.4 Hz, 四重線芳香族 C); 161.1 (芳香族 C - O); 161.1 (C = N); 176.9 (CONH₂)。

【0185】

b) (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (I b)

実施例 8, ステップ b) と同一手順に従い、(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジリデンアミノ] プロパンアミドから (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドを 93% 収率で製造する。HPLC (実施例 17 B 参照) により測定した (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド含量は 0.02 重量% である。

【実施例 10】

【0186】

(S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩 (I I c) の製造

a) 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (V a)

窒素雰囲気下に維持する 4 L 丸底フラスコに 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (400 g, 3.28 mol) と炭酸カリウム (453 g, 3.28 mol) とトルエン (2 L) と 3 - フルオロベンジルクロリド (1400 g, 9.68 mol) を順に加え、混合物を 5 日間還流撹拌する。この時点で GC 分析によると、反応混合物は 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドと 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを 91.4 : 8.6 (面積 / 面積, 実施例 16 A 参照

）の比で含有していることがわかる。

【0187】

反応混合物を室温まで冷却した後、攪拌下に水2 Lを加える。有機相を分離し、溶媒が消失するまで溶媒を35で減圧(20 mmHg)蒸留する。次に圧力を3 mmHgまで下げ、外部温度を300まで上げ、255 ~ 265で蒸留する画分(40.6 g)を集める。

【0188】

GC分析によると、標記化合物のモノアルキル化誘導体(IVa)に対するC, O-ジベンジル化誘導体(Va)面積/面積比は99.6:0.4(面積/面積, 実施例16A参照)である。

【0189】

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) (Bruker AV300) (TMSに対するppm): 4.05 (2H, s, CH_2); 5.13 (2H, s, OCH_2); 6.85 - 7.40 (9H, m, 芳香族H); 7.73 - 7.79 (2H, m, $\text{C}=\text{O}$ に対してオルト位の芳香族H); 9.88 (s, CHO)。

【0190】

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3) (Bruker AV300) (ppm): 36.1 (CH_2); 69.4 (CH_2O); 111.4 (芳香族CH); 112.9及び113.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 20\text{ Hz}$, 芳香族CH), 113.9及び114.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 22\text{ Hz}$, 芳香族CH); 114.9及び115.0 (d, $J_{\text{C-F}} = 21\text{ Hz}$, 芳香族CH); 115.7及び115.9 (d, $J_{\text{C-F}} = 25\text{ Hz}$, 芳香族CH); 122.6 (d, $J_{\text{C-F}} = 3\text{ Hz}$, 芳香族CH); 124.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 3\text{ Hz}$, 芳香族CH); 129.6及び129.8 (d, $J_{\text{C-F}} = 8\text{ Hz}$, 芳香族CH); (d, $J_{\text{C-F}} = 7\text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 129.9 (四重線芳香族C); 130.0 (四重線芳香族C); 130.1及び130.2 (d, $J_{\text{C-F}} = 7\text{ Hz}$, 芳香族CH); 131.2 (芳香族CH); 131.5 (芳香族CH); 138.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 7\text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 142.3 (d, $J_{\text{C-F}} = 7\text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 161.0, 161.2及び164.4 (d, $J_{\text{C-F}} = 240$, オーバーラップする2本のC-F); 190.8 (CHO)。

【0191】

b) (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジロキシ)ベンジリアミノ]プロパンアミド(IIa)

3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒド(35.6 g, 0.105 mol)を500 mLフラスコに加え、L - アラニンアミド塩酸塩(14.8 g, 0.119 mol)のメタノール溶液170 mLに攪拌下にトリエチルアミン(12 g, 0.119 mol)を注意深く加えることにより予め調製した溶液を室温に加える。

【0192】

この反応混合物を1時間室温で攪拌した後、1.8 Lオートクレーブに移し、含水(50% H_2O) Pt/C 5% 3.4 gを加える。

【0193】

オートクレーブから空気を窒素パージした後、水素を5.0バールで導入する。

【0194】

35の温度で反応を3 ~ 5時間実施する。

【0195】

室温まで冷却して触媒を濾別後、約65 gの残渣が得られるまで溶媒を減圧留去する。この残渣に酢酸エチル(340 mL)と水(250 mL)の混合物を加え、明白な2相が得られるまで不均一混合物を40まで昇温し、攪拌せずにこの温度に維持する。2相を分離し、約50 gの残渣が得られるまで有機相を減圧蒸留する。

【0196】

この残渣を酢酸エチル 220 mL に溶かし、外部温度 40 で溶媒を減圧留去する。この操作を 2 回繰返し、標記化合物を固体残渣として得る。

【0197】

c) (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩 (I I c)

2 L ガラス反応器で (S) - 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド塩基 42.4 g (0.103 mol) を酢酸エチル 950 mL に溶かす。

【0198】

溶液を攪拌下に 50 ~ 55 に加熱し、この温度に 1 時間維持する。この溶液にメタンスルホン酸 14.5 g (0.15 mol) を 20 分間加える後、温度を 90 分間で 20 まで下げた。30 分後に固形分を濾取し、50 で減圧乾燥した後、メタノール (メタノール : 生成物 1 : 5 重量) から結晶させ、m.p. 181 (キャピラリー) の (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩 25.1 g を得る。

【0199】

^1H -NMR (DMSO - d_6) (Bruker AV300) (TMS に対する ppm) : 1.44 (3 H , d , $J = 7\text{ Hz}$, CH_3) ; 2.35 (3 H , s , CH_3SO_3) ; 3.81 (1 H , q , $J = 7\text{ Hz}$, H - 2) , 3.99 (2 H , bs , ベンジル CH_2) ; 4.02 (2 H , AB 系 , CH_2N -) ; 5.17 (2 H , s , CH_2OR) ; 6.98 - 7.63 (11 H , m , 芳香族 H) ; 7.62 及び 7.75 (2 H , bs , アミド NH_2) ; 9.02 (2 H , broad , NH_2^+) 。

【0200】

^{13}C -NMR (DMSO - d_6) (Bruker AV300) (ppm) : 15.9 (CH_3) ; 35.5 (CH_2) ; 39.7 ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$) ; 48.1 (CH_2NR) ; 54.4 (CH) ; 68.4 (OCH_2) ; 112.2 (芳香族 CH) ; 112.7 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 22\text{ Hz}$, 芳香族 CH) ; 113.8 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 22\text{ Hz}$, 芳香族 CH) ; 114.5 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 22\text{ Hz}$, 芳香族 CH) ; 115.2 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 22\text{ Hz}$, 芳香族 CH) ; 123.2 (芳香族 CH) ; 123.8 ; 124.6 (芳香族 CH) ; 128.7 及び 130.0 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 6\text{ Hz}$, 芳香族 CH) ; 130.04 (芳香族 CH) ; 130.3 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 6\text{ Hz}$, 芳香族 CH) ; 132.6 (芳香族 CH) ; 139.8 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 7\text{ Hz}$) ; 143.4 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 7\text{ Hz}$) ; 158.1 , 160.5 及び 163.7 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 240$, C - F) ; 160.6 及び 163.8 (d , $J_{\text{C}-\text{F}} = 240$, C - F) ; 170.5 (CON) 。

【0201】

(S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (I I a) をメタンスルホン酸塩 (I I c) として 0.12 重量% 含有する J. Med. Chem. , 1998 , 41 , 579 , 方法 A に従って製造するサフィナミドメタンスルホン酸塩 (I c) 200 g から (I I a) のサンプル (90 mg) を分取 HPLC により単離する。

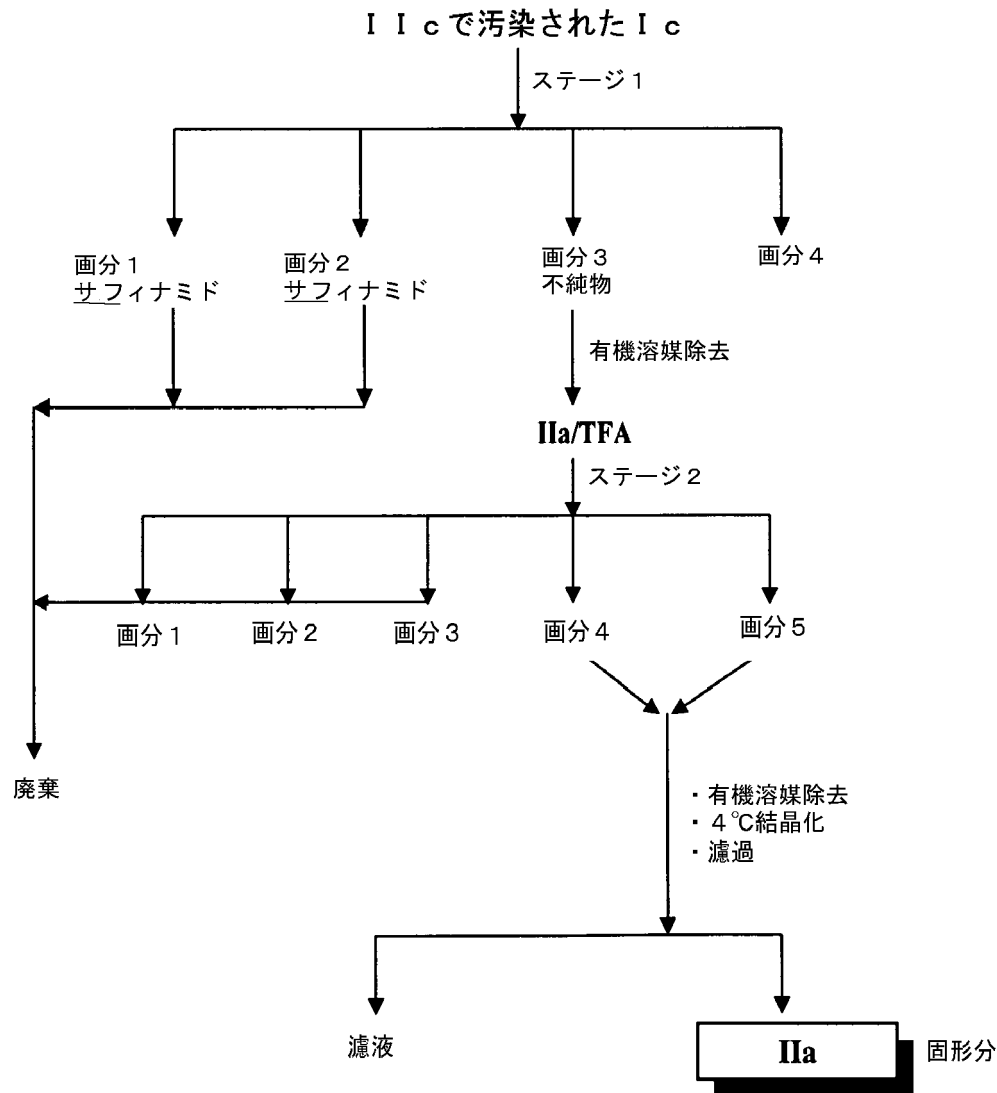
【0202】

分離は下記スキームに従って 2 段階 (ステージ 1 及びステージ 2) で実施する。

【0203】

【化 10】

0.12重量% I I cで汚染されたサフィナミドメタンスルホン酸塩 (I c) の分取HPLCによるI I aの単離



【0204】

ステージ 1

第1段階の目的はI I a / T F A (トリフルオロ酢酸) 含量の多い粗生成物を単離することである。

【0205】

分取HPLC条件は以下の通りである。

【0206】

分取HPLC条件：

機器：Waters Delta Prep 4000 (往復ポンプ、低圧ミキサー付きグラジエントコントローラー)

Radial Compression Module Prep LC Base (Waters)

Jasco 7125 可変波長UV検出器, o.p. 0.2 mm

Merk D2000 プリンター - プロッター

カラム：Delta Pak C18, 15 μm, 40 × 100 mm (Waters)。

溶離液A：70 / 30, 水 / アセトニトリル + 0.1 % T F A

溶離液B：30 / 70, 水 / アセトニトリル + 0.1 % T F A

流速：27.0 ml / 分

勾配：40分間，100% A一定 1分間で100% B

検出：UV 227 nm

注入：水50 ml 中5 g (ポンプ入口側配管Dによる)

【0207】

ステージ2

この段階はTFAをIIa / TFAから除去し、IIaを更に精製するために必要である。

【0208】

以下の分取HPLC条件を使用してIIa / TFAをクロマトグラフィー精製する。

10

【0209】

画分4及び5を合わせ、アセトニトリルが完全に除去されるまで40で減圧蒸発させる。残留水溶液を4の冷蔵庫に保存する。不溶分を濾過により単離し、室温で減圧乾燥し、IIa (90 mg; HPLC純度100%)を得る。

【0210】

分取HPLC条件：

機器：Waters Delta Prep 4000 (往復ポンプ、低圧ミキサー付きグラジエントコントローラー)

Jasco 7125 可変波長UV検出器，o.p.o. 2 mm

Merk D2000 プリンター - プロッター

20

カラム：Symmetry C18, 7 μm, 20 x 250 mm (Waters)

溶離液A：70 / 30，水 / アセトニトリル

溶離液B：30 / 70，水 / アセトニトリル

流速：15.0 ml / 分

勾配：20分間，100% A一定 1分間で100% B

検出：UV 227 nm

注入：不純物「IIa / TFA」溶液50 ml (ポンプ入口側配管Dによる)

【実施例11】

【0211】

(S)-2-[3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩(II d)の製造

30

a) 3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(V b)

3-フルオロベンジルクロリドの代わりに2-フルオロベンジルクロリドを使用した以外は10分の1の規模で実施例10，ステップa)と同一手順に従うことにより3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドを製造する。モル収率は3%であり、GC分析により測定した純度は98.1(面積%，実施例16A参照)である。生成物はm.p. 71 (キャピラリー)である。

【0212】

¹H-NMR：(CDCl₃，300 MHz，298 K) (TMSに対するppm)：4.06 (2H，s，CH₂)；5.23 (2H，s，OCH₂)；6.95 - 7.40 (9H，m，芳香族H)；7.67 (1H，bd，J = 0.9 Hz，C=Oに対してオルト位の芳香族H及びCH₂)；7.76 (1H，dd，J₁ = 2.1 Hz，J₂ = 8.3 Hz，C=Oに対してオルト位の芳香族H及び芳香族CH)；9.84 (1H，s，CHO)。

40

【0213】

¹³C-NMR：(CDCl₃，75.4 MHz，298 K) (ppm)：29.2 (CH₂)；64.1 (OCH₂)；111.4 (芳香族CH)；115.4 (d，J_{C-F} = 22.0 Hz，芳香族CH)，115.5 (d，J_{C-F} = 21.1 Hz，芳香族CH)；123.3 (d，J_{C-F} = 14.2 Hz，四重線芳香族C)；124.1 (d

50

, $J_{C-F} = 2.6 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 124.5 (d, $J_{C-F} = 3.2 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 126.6 (d, $J_{C-F} = 15.5 \text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 128.2 (d, $J_{C-F} = 8.1 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 129.6 (d, $J_{C-F} = 6.2 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 129.6 (四重線芳香族C); 130.0 (四重線芳香族C); 130.2 (d, $J_{C-F} = 8.3 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 131.1 (芳香族CH); 131.3 (d, $J_{C-F} = 4.1 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 131.8 (芳香族CH); 160.5 (d, $J_{C-F} = 246.8 \text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 161.2 (d, $J_{C-F} = 245.1 \text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 161.3 (四重線芳香族C); 191.1 (CHO)。

【0214】

b) (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (I I b)

10

3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドの代わりに3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを使用した以外は実施例10, ステップb) と同一手順に従い、(S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドを製造する。収率は83%であり、m.p. 161 (キャピラリー) である。

【0215】

^1H -NMR: (CDCl₃, 300 MHz, 298 K) (TMSに対するppm): 1.32 (3H, d, $J = 6.7 \text{ Hz}$, CH₃); 1.97 (1H, bs, NH); 3.22 (1H, q, $J = 6.7 \text{ Hz}$, CH-CO); 3.67 (2H, ABq, $J = 12.8 \text{ Hz}$, NCH₂ のジアステレオトピックH); 4.03 (2H, s, CH₂); 5.12 (2H, s, OCH₂); 5.98 (1H, bs, NH₂); 6.89 (1H, d, $J_{ortho} = 8.3 \text{ Hz}$, CH₂NHに対してオルト位の芳香族H及び芳香族CH); 6.95 - 7.40 (10H, m, 芳香族H)。

20

【0216】

^{13}C -NMR: (CDCl₃, 75.4 MHz, 298 K) (ppm): 19.6 (CH₃); 29.2 (CH₂); 52.0 (NHCH₂); 57.7 (H₂NC OCH); 63.8 (OCH₂); 111.7 (芳香族CH); 115.2 (d, $J_{C-F} = 21.9 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 115.3 (d, $J_{C-F} = 21.3 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 124.0 (d, $J_{C-F} = 3.5 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 124.3 (d, $J_{C-F} = 2.9 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 124.3 (d, $J_{C-F} = 14.4 \text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 127.5 (芳香族CH); 127.6 (d, $J_{C-F} = 15.0 \text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 127.8 (d, $J_{C-F} = 7.5 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 128.8 (四重線芳香族C); 129.0 - 130.0 (m, 2 芳香族CH); 130.5 (芳香族CH); 131.3 (d, $J_{C-F} = 4.6 \text{ Hz}$, 芳香族CH); 131.8 (四重線芳香族C); 155.6 (四重線芳香族C); 160.4 (d, $J_{C-F} = 245.8 \text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 161.2 (d, $J_{C-F} = 244.6 \text{ Hz}$, 四重線芳香族C); 178.2 (CONH₂)。

30

【0217】

40

c) (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩 (I I d)

(S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドを出発材料として使用した以外は実施例10, ステップc) と同一手順に従い、(S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩を製造する。収率は89%であり、m.p. 190 (キャピラリー) である。

【0218】

^1H -NMR: (DMSO-d₆, 300 MHz, 298 K) (TMSに対するppm): 1.42 (3H, d, $J = 6.8 \text{ Hz}$, CH₃CH); 2.33 (3H, s, CH

50

$_3\text{SO}_3$) ; 3.50 - 4.20 (5H, m, CH-CO, CH₂, NCH₂ のジアステレオトピックH) ; 5.19 (2H, s, OCH₂) ; 6.95 - 8.00 (HH, m, 芳香族H) ; 9.02 (2H, bs, NH₂⁺)。

【0219】

¹³C-NMR : (DMSO-d₆, 75.4 MHz, 298 K) (ppm) : 16.5 (CH₃) ; 28.8 (CH₂) ; 48.6 (NHCH₂) ; 54.9 (H₂NCOCH) ; 64.3 (OCH₂) ; 112.8 (芳香族CH) ; 115.0 - 117.0 (2芳香族CH) ; 124.2 (d, J_{C-F} = 14.4 Hz, 四重線芳香族C) ; 124.4 (四重線芳香族C) ; 124.8 (芳香族CH) ; 125.0 (芳香族CH) ; 127.3 (d, J_{C-F} = 16.1 Hz, 四重線芳香族C) ; 128.6 (四重線芳香族C) ; 128.8 (芳香族CH) ; 129.0 - 133.0 (m, 5芳香族CH) ; 156.9 (四重線芳香族C) ; 160.8 (d, J_{C-F} = 245.2 Hz, 四重線芳香族C) ; 160.9 (d, J_{C-F} = 243.5 Hz, 四重線芳香族C) ; 171.1 (CONH₂)。

10

【実施例12】

【0220】

不純物3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(Va)1重量%で汚染された4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(IVa)からの(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(サフィナミド)メタンスルホン酸塩(Ic)の製造

20

4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(10g; GC純度98.8, 面積%)に1%3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドを加え、実施例6と同一手順に従い、混合物を(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドサフィナミド塩基に変換した。収率は84%であり、不純物(IIa)含量は0.84重量%(実施例17B参照)である。

【0221】

実施例7と同一手順に従い、遊離塩基(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(Ia)を対応するメタンスルホン酸塩に変換し、HPLC(実施例17B参照)により測定した不純物(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩(IIc)含量が0.62重量%のメタンスルホン酸塩(Ic)を98%収率で得る。

30

【実施例13】

【0222】

不純物(IIc)で汚染されたサフィナミドメタンスルホン酸塩(Ic)の結晶化

5種類の異なる溶媒系を使用し、還流温度で溶解させ、室温に冷却することにより、実施例12に従って得られるHPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩(IIc)含量が0.62重量%のサフィナミドメタンスルホン酸塩を結晶化させる。

40

【0223】

結果を下表5に報告する。

【0224】

【表 6】

表 5

試験番号	溶媒系及び量(mL/g)	結晶化後の Ic 中の IIc%w/w(*)	モル収率%
13a	2-PrOH/MeOH 2:1, 45	0.28	44.9
13b	EtOAc/MeOH 4:1, 50	0.15	29.6
13c	EtOH, 10	0.30	73.2
13d	アセトン/H ₂ O ~27:1, 40.5	0.08	20.6
13e	アセトニトリル/H ₂ O 60:1, 30.5	0.09	69.3

(*)%(w/w)は実施例 17B に従って評価した。

10

【実施例 14】

【0225】

従来技術に記載の方法による (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (サフィナミド , Ia) メタンスルホン酸塩 (Ic) の製造

14.1 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IVa) の製造

14.1.a) US 6,335,354 B2 の実施例 1a の手順

US 6,335,354 B2 の実施例 1a に記載の手順により 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IVa) を製造する。

【0226】

20

即ち、3 - フルオロベンジルクロリド (2.86 g , 19.80 mmol) と 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (3.03 g , 24.80 mmol) と K₂CO₃ (10.30 g , 74.50 mmol) と NaI (137.1 mg , 0.91 mmol) とエタノール (40 mL) の混合物を 70 分間で還流温度まで加熱し、還流温度に 4 時間 15 分間維持する。

【0227】

反応混合物のワークアップ後、4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを黄色油状物として 95 % 収率で単離する。

【0228】

生成物は GC 純度 97.6 (面積 % , 実施例 16A 参照) であり、GC (実施例 16B 参照) により測定した 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (Va) 含量 0.14 重量 % である。

30

【0229】

14.1.b) J. Agric. Food Chem, 27, 4, 1979 の手順

J. Agric. Food Chem, 27, 4, 1979 に報告されている手順により 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (IVa) を製造する。

【0230】

即ち、3 - フルオロベンジルクロリド (14.5 g , 100 mmol) を 4 - ヒドロキシベンズアルデヒド (12.2 g , 100 mmol) と NaOH (4.0 g , 100 mmol) のエタノール (100 mL) 溶液に窒素雰囲気下で攪拌下に加える。

40

【0231】

混合物を 25 分間で還流温度まで徐々に加熱し、還流温度で 6 時間 20 分間攪拌する。反応混合物を濾過する後、減圧濃縮し、4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (23.43 g) を黄色固体残渣として得る。ジクロロメタン (250 mL) を残渣に加え、不溶分を濾過し、得られる溶液を減圧濃縮し、4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを黄色固体として 80.4 % 収率で得る。生成物は GC 純度 91.6 (面積 % , 実施例 16A 参照) であり、GC (実施例 16B 参照) により測定した 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (Va) 含量 0.13 重量 % である。

【0232】

50

14.2 (S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(Ia)とそのメタンスルホン酸塩(Ic)の製造

14.2.a) J. Med. Chem., 1998, 41, 579, 方法Aの手順

実施例14.1.a.に記載したように製造する4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(10 mmol)とL-アラニンアミド塩酸塩(1.37 g, 11 mmol)を反応させる後にNaBH₃CN(0.50 g, 8 mmol)で還元することにより(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(Ia)を製造する。反応混合物のワークアップとフラッシュクロマトグラフィーによる精製後、(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドが白色固体として68.7%収率で単離される。生成物はHPLC純度96.2(面積%, 実施例17A参照)であり、(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(IIa)含量0.15重量%(実施例17B参照)である。

10

【0233】

透明な溶液が得られるまで(S)-2[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(1.50 g, 4.96 mmol)と酢酸エチル(40.2 mL)の混合物を50℃まで加熱する。溶液に攪拌下にメタンスルホン酸(0.53 g, 5.51 mmol)を15分間加え、得られる不均一混合物を攪拌下に90分間で20℃まで冷却する。20℃で30分後に、固形分を濾取し、酢酸エチル(6 mL)で洗浄し、50℃で15時間減圧乾燥し、(S)-2[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩(Ic)を白色固体として96.1%収率で得る。生成物はHPLC純度98.6(面積%, 実施例17A参照)であり、HPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩(IIc)含量0.10重量%である。

20

【0234】

14.2.b) J. Med. Chem., 1998, 41, 579, 方法Aの手順

実施例14.1.b.に記載したように製造する4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(10 mmol)とL-アラニンアミド塩酸塩(1.37 g, 11 mmol)を反応させる後にNaBH₃CN(0.50 g, 8 mmol)で還元することにより、実施例14.2.aに従って(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(Ia)を製造する。

30

【0235】

(S)-2[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(Ia)は白色固体として66.5%収率で得られる。生成物はHPLC純度88.5(面積%, 実施例17A参照)であり、HPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(IIa)含量0.064重量%である。実施例14.2.aに従ってメタンスルホン酸で処理することにより、(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(Ia)を対応するメタンスルホン酸塩(Ic)に88.9%収率で変換する。生成物はHPLC純度97.7(面積%, 実施例17A参照)であり、HPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩(IIc)含量0.05重量%である。

40

【実施例15】

【0236】

従来技術に記載の方法による(S)-2-[4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(ラルフィナミド, Ib)メタンスルホン酸塩(Id)の製造

15.1 4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(IVb)の製造

50

15.1.a) US 6,335,354 B2の実施例1aの手順

実施例14.1.a)に従い、2-フルオロベンジルクロリド(14.3g, 98 mmol)と4-ヒドロキシベンズアルデヒド(15.1g, 123 mmol)と K_2CO_3 (51g, 369 mmol)とNaI(500 mg, 3.3 mmol)とエタノール75 mLから4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒド(IVb)を製造する。

【0237】

混合物を12時間還流温度に維持する。反応混合物のワークアップ後、4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒドが黄色油状物として75%収率で得られる。生成物はGC純度92.1(面積%, 実施例16A参照)であり、GC(実施例16B参照)により測定した3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒド含量0.25重量%である。

【0238】

15.1.b) J. Agric. Food Chem, 27, 4, 1979の手順

実施例14.1.b)に従い、2-フルオロベンジルクロリド(18.0g, 123 mmol)と4-ヒドロキシベンズアルデヒド(15.3g, 125 mmol)とNaOH(5.0g, 12 mmol)とエタノール(125 mL)から4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒド(IVb)を製造する。

【0239】

混合物を25分間で還流温度まで加熱し、攪拌下で還流温度に12時間維持する。

【0240】

反応混合物を実施例14.1.b)に従ってワークアップ後、4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒドが黄色固体として90.0%収率で得られる。生成物はGC純度90.4(面積%, 実施例16A参照)であり、GC(実施例16B参照)により測定した3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒド(Vb)含量0.14重量%である。

【0241】

15.2 (S)-2-[4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(IIb)とそのメタンスルホン酸塩(Id)の製造

15.2.a) J. Med. Chem., 1998, 41, 579, 方法Aの手順

4-(3-フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒドの代わりに4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンズアルデヒド(10 mmol, 実施例15.1aに記載したように製造)を使用した以外は実施例14.2.a)の手順に従い、(S)-2-[4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(IIb)を製造する。

【0242】

(S)-2-[4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドは白色固体として67.3%収率で得られる。生成物はHPLC純度86.7(面積%, 実施例17A参照)であり、HPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(IIIb)含量0.22重量%である。

【0243】

(S)-2-[4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(1.50g, 4.96 mmol)とプロパン-2-オール(10.5 mL)の混合物を50℃まで加熱し、透明な溶液が得られるまでこの温度に維持する。攪拌下にメタンスルホン酸(0.48g, 5.01 mmol)を15分間加える。

【0244】

次に不均一混合物を攪拌下に2時間で20℃まで冷却する。20℃で1時間後に固形分を濾取し、減圧乾燥し、(S)-2-[4-(2-フルオロベンジロキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩を白色固体として89.1%収率で得る。生成物はHPLC純度96.9(面積%, 実施例17A参照)であり、HPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フル

10

20

30

40

50

オロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩(II d)含量0.14重量%である。

【0245】

15.2.b) J. Med. Chem., 1998, 41, 579, 方法Aの手順

4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒドの代わりに4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド(10 mmol, 実施例15.1.bに従って製造)を使用することにより、実施例14.2.bに従って(S)-2-[4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(II b)を製造する。

【0246】

(S)-2-[4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドは白色固体として58.8%収率で得られる。生成物はHPLC純度83.8(面積%, 実施例17A参照)であり、HPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(II b)含量0.15重量%である。

【0247】

(S)-2-[4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(II b)を対応するメタンスルホン酸塩(II d)に白色固体として89.4%収率で変換する。生成物はHPLC純度95.2(面積%, 実施例17A参照)であり、HPLC(実施例17B参照)により測定した(S)-2-[3-(2-フルオロベンジル)-4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミドメタンスルホン酸塩含量0.11重量%である。

【実施例16】

【0248】

実施例16A

4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド及び4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンズアルデヒド純度のGC測定

試験調製物

サンプル約100 mgを塩化メチレン10 mlに溶かす。

【0249】

クロマトグラフィー条件

クロマトグラフィー手順は下記条件を使用することにより実施する。

- 長さ60 m及び内径0.32 mmの溶融シリカキャピラリーカラムRTX 35(35%ジフェニル-65%ジメチルポリシロキサン)、膜厚=0.25 µm;
- キャリヤガスとして圧力150 kPaのヘリウムガス;
- スプリット流速25 ml/分;
- インジェクター温度290 °C;
- 検出器(FID)温度290 °C;

以下の温度プログラムを使用する。

【0250】

【表7】

時間(分)	温度(°C)	速度(°C/分)	摘要
0-5	150	-	恒温
5-11	150→240	15	直線勾配
11-19	240	-	恒温
19-20.7	240→290	30	直線勾配
20.7-40	290	-	恒温

【0251】

手順

試験調製物 1 μ l を注入する。クロマトグラムを記録し、面積百分率計算により生成物純度を計算する。

【 0 2 5 2 】

不純物同定

4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V a) :

保持時間 :

4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド保持時間は約 1.7 である。

4 - ヒドロキシベンズアルデヒド相対保持時間は約 0.52 である。

4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド相対保持時間は約 0.98 である。

10

4 - (4 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド相対保持時間は約 1.01 である。

4 - ベンジルオキシベンズアルデヒド相対保持時間は約 1.02 である。

3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド相対保持時間は約 1.78 である。

4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V b) :

保持時間 :

4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド保持時間は約 1.7 である。

4 - ヒドロキシベンズアルデヒド相対保持時間は約 0.53 である。

4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド相対保持時間は約 1.02 である。

20

4 - (4 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド相対保持時間は約 1.03 である。

4 - ベンジルオキシベンズアルデヒド相対保持時間は約 1.04 である。

3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド相対保持時間は約 1.81 である。

【 0 2 5 3 】

実施例 16B

4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V b) における 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (V b) 含量と 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (I V a) における 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド (V a) 含量の GC 測定

30

4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドについて検討した公知近縁物質は 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドとし、4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドについては 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドを検討する。以下の条件に従って測定を行う。

【 0 2 5 4 】

内部標準溶液

40

塩化メチレン中濃度 1.5 mg / ml の 3 , 4 , 5 - トリメトキシベンズアルデヒド溶液を調製する (I S) 。

【 0 2 5 5 】

4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドにおける 3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド測定用参照溶液 :

3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド参照標準約 20 mg と 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド参照標準 20 mg を 20 mL 容量フラスコで正確に計量し、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、この溶液 500 μ L を 5 mL 容量フラスコに移し、I S 溶液 500 μ L を加え、希釈剤で定容に希釈し、3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズア

50

ルデヒド及び 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド約 1 0 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (約 0 . 1 0 % に対応) を含有する溶液を得る。

【 0 2 5 6 】

4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドにおける 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド測定用参照溶液 :
3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド参照標準約 2 0 m g と 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド参照標準 2 0 m g を 2 0 m L 容量フラスコで正確に計量し、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、この溶液 5 0 0 μL を 5 m L 容量フラスコに移し、I S 溶液 5 0 0 μL を加え、希釈剤で定容に希釈し、3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド及び 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド約 1 0 0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (約 0 . 1 0 % に対応) を含有する溶液を得る。

10

【 0 2 5 7 】

試験溶液 :

試験生成物約 5 0 0 m g を 5 m L 容量フラスコで正確に計量し、I S 溶液 5 0 0 μL を加え、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、約 1 0 0 m g / m L の既知濃度の溶液を得る。

【 0 2 5 8 】

クロマトグラフィー条件

クロマトグラフィー手順は下記条件を使用することにより実施する。

- カラム : 長さ 6 0 m 及び内径 0 . 3 2 m m の溶融シリカキャピラリーカラム R T X 3 5 (3 5 % ジフェニル - 6 5 % ジメチルポリシロキサン) 、膜厚 = 0 . 2 5 μm ;
- 圧力 1 5 0 k P a のキャリヤー (ヘリウム) ;
- スプリット流速 2 5 m L / 分 ;
- インジェクター温度 2 9 0 ;
- 検出器 (F I D) 温度 2 9 0 ;
- 温度プログラム : 0 - 5 分 : 1 5 0 恒温 , 5 - 1 1 分 : 速度 1 5 / 分で 1 5 0 2 4 0 直線 , 1 1 - 1 9 分 : 2 4 0 恒温 , 1 9 - 2 1 分 : 速度 3 0 / 分で 2 4 0 2 9 0 直線 , 2 1 - 4 0 分 2 9 0 恒温 ;
- 希釈剤 : 塩化メチレン ;
- 注入容量 1 μL 。

20

30

【 0 2 5 9 】

手順 :

ブランク (希釈剤) 、参照溶液、試験溶液を注入し、クロマトグラムを記録する。

4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド保持時間が約 1 8 分であり ;
3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド
相対保持時間が約 1 . 7 であるか、又は
4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド保持時間が約 1 8 分であり ;
3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド
相対保持時間が約 1 . 7 であることを参照クロマトグラムで確認する。

3 , 4 , 5 - トリメトキシベンズアルデヒド (I S) 相対保持時間は約 0 . 7 である。
試験した 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドにおける 3 - (2 - フル
オロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒド又は試験した 4
- (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドにおける 3 - (3 - フルオロベンジ
ル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデヒドの含量百分率を内部標準計
算により計算する。

40

【 0 2 6 0 】

(3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアルデ
ヒドと 3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンズアル
デヒドの定量限界 (L O Q) 値は 0 . 0 0 5 重量 % である。検討する両者不純物の検出限
界 (L O D) 値は 0 . 0 0 2 5 重量 % である。

50

【実施例 17】

【0261】

実施例 17 A

(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(サフィナミド)、I a とそのメタンスルホン酸塩(I c)、(S)-2-[4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(ラルフィナミド)、I b とそのメタンスルホン酸塩(I d)の純度のHPLC測定

以下のクロマトグラフィー手順は生成物の遊離塩基形態(I a, I b)及びメタンスルホン酸塩(I c, I d)の両者に適している。

【0262】

希釈剤

移動相

【0263】

試験溶液

生成物約25mgを25ml容量フラスコで正確に計量し、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、約1.0mg/mlの既知濃度の溶液を得る。

【0264】

クロマトグラフィー条件

クロマトグラフィー手順は下記条件を使用することにより実施する。

- カラム: Waters Symmetry C8, 150 x 4.6 mm, 5 µ;
- 検出: UV 220 nm;
- カラム温度: 30 °;
- 移動相: 40% 溶媒 A + 10% 溶媒 B + 50% 溶媒 C に 1.0 g/l オクタンスルホン酸ナトリウムを添加;
- 溶媒 A: 緩衝液 = 0.05 M KH₂PO₄;
- 溶媒 B: アセトニトリル;
- 溶媒 C: メタノール;
- アイソクラティック溶出, 試験時間: 60 分;
- 流速: 1.0 ml/分;
- 注入容量: 10 µl。

【0265】

手順

試験溶液を注入し、クロマトグラムを記録し、生成物純度を面積百分率計算により計算する。

【0266】

(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(サフィナミド)及び近縁不純物同定

保持時間:

(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド保持時間は約5.5分である。

(S)-2-[4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロピオン酸相対保持時間は約0.73である。

(S)-2-[3-(3-フルオロベンジル)-4-(3-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド相対保持時間は約4.08である。

【0267】

(S)-2-[4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド(ラルフィナミド)及び近縁不純物同定

保持時間:

(S)-2-[4-(2-フルオロベンジルオキシ)ベンジルアミノ]プロパンアミド保持時間は約5.5分である。

10

20

30

40

50

(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロピオン酸相対保持時間は約 0 . 7 3 である。

(S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド相対保持時間は約 4 . 0 8 である。

【 0 2 6 8 】

実施例 1 7 B

(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (遊離塩基 I b 及びメタンスルホン酸塩 I d) における (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (遊離塩基 I I b 及びメタンスルホン酸塩 I I d) と (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (遊離塩基 I a 及びメタンスルホン酸塩 I c) における (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (遊離塩基、 I I a 及びメタンスルホン酸塩 I I c) の H P L C 測定

以下の条件に従い、(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (遊離塩基及びメタンスルホン酸塩) サンプルにおける (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (遊離塩基及びメタンスルホン酸塩) と (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (遊離塩基及びメタンスルホン酸塩) サンプルにおける (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (遊離塩基及びメタンスルホン酸塩) の測定を実施する。

【 0 2 6 9 】

(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドにおける (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド測定用参照溶液：

(S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩参照標準約 3 0 m g と (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド参照標準 2 0 m g を 5 0 m L 容量フラスコで正確に計量し、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、この溶液 1 . 0 m L を希釈剤で 2 0 m L まで希釈し (第 1 回希釈) し、この希釈液 1 . 0 m L を希釈剤で 2 0 m L まで希釈し (第 2 回希釈) 、 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (約 0 . 1 2 %) 約 1 . 2 0 μ g / m L と (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩約 1 . 0 0 μ g / m L (約 0 . 1 0 %) を含有する溶液を得る。

【 0 2 7 0 】

(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩における (S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩測定用参照溶液：

(S) - 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩参照標準約 3 0 m g と (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩参照標準 2 0 m g を 5 0 m L 容量フラスコで正確に計量し、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、この溶液 1 . 0 m L を希釈剤で 2 0 m L まで希釈し (第 1 回希釈) し、この希釈液 1 . 0 m L を希釈剤で 2 0 m L まで希釈し (第 2 回希釈) 、 2 - [3 - (2 - フルオロベンジル) - 4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (メタンスルホン酸塩として約 0 . 1 5 %) 約 1 . 2 0 μ g / m L と (S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩約 1 . 0

0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (約 0.10%) を含有する溶液を得る。

【0271】

(S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドにおける (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド測定用参照溶液 :

(S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド参照標準約 24 mg と (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド参照標準 20 mg を 50 mL 容量フラスコで正確に計量し、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、この溶液 1.0 mL を希釈剤で 20 mL まで希釈し (第1回希釈) し、この希釈液 1.0 mL を希釈剤で 20 mL まで希釈し (第2回希釈)、2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (約 0.12%) 約 1.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩約 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (約 0.10%) を含有する溶液を得る。

10

【0272】

(S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩における (S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩測定用参照溶液 :

(S) - 2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド参照標準約 24 mg と (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩参照標準 20 mg を 50 mL 容量フラスコで正確に計量し、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、この溶液 1.0 mL を希釈剤で 20 mL まで希釈し (第1回希釈) し、この希釈液 1.0 mL を希釈剤で 20 mL まで希釈し (第2回希釈)、2 - [3 - (3 - フルオロベンジル) - 4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (メタンスルホン酸塩として約 0.15%) 約 1.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と (S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩約 1.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (約 0.10%) を含有する溶液を得る。

20

【0273】

試験溶液 :

試験生成物約 25 mg を 25 mL 容量フラスコで正確に計量し、希釈剤で定容に溶解及び希釈し、約 1.0 mg/mL の既知濃度の溶液を得る。

30

【0274】

クロマトグラフィー条件 :

クロマトグラフィー手順は下記条件を使用することにより実施する。

- カラム : Waters Symmetry C8 150 x 4.6 mm, 5 μ 、又は同等装置 ;

- カラム温度 : 30 ;

- 移動相 : 40% 溶媒 A : 10% 溶媒 B : 50% 溶媒 C の混合物に 1 g/L オクタンスルホン酸ナトリウムを添加 ;

40

溶媒 A : 緩衝液 0.05 M KH_2PO_4 ;

溶媒 B : アセトニトリル ;

溶媒 C : メタノール ;

- アイソクラティック溶出 ;

- 試験時間 : 60 分 ;

- 流速 : 1.0 mL / 分 ;

- 検出 : UV 220 nm ;

- 注入容量 : 100 μL ;

- 希釈剤 : 移動相。

50

【 0 2 7 5 】

手順：

ブランク（希釈剤）、参照溶液、試験溶液を注入し、クロマトグラムを記録する。

参照クロマトグラムで以下のシステム適合性パラメーターを確認する：

（ S ） - 2 - [4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド保持時間が約 5 . 2 分であり；

（ S ） - 2 - [4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドピークの U S P テーリングが 0 . 8 ~ 1 . 5 であり；

（ S ） - 2 - [3 - （ 2 - フルオロベンジル ） - 4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド相対保持時間が約 5 . 1 であるか、又は

（ S ） - 2 - [4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド保持時間が約 5 . 5 分であり；

（ S ） - 2 - [4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドピークの U S P テーリングが 0 . 8 ~ 1 . 5 であり；

（ S ） - 2 - [3 - （ 3 - フルオロベンジル ） - 4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド相対保持時間が約 4 . 1 である。

【 0 2 7 6 】

システム適合性が得られるように移動相を調節する。

【 0 2 7 7 】

試験した（ S ） - 2 - [4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド（遊離塩基及びメタンスルホン酸塩）サンプルにおける（ S ） - 2 - [3 - （ 2 - フルオロベンジル ） - 4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド（遊離塩基及びメタンスルホン酸塩）と試験した（ S ） - 2 - [4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド（遊離塩基及びメタンスルホン酸塩）サンプルにおける（ S ） - 2 - [3 - （ 3 - フルオロベンジル ） - 4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド（遊離塩基及びメタンスルホン酸塩）の含量百分率を外部標準計算により計算する。

【 0 2 7 8 】

対応する（ S ） - 2 - [4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド及び（ S ） - 2 - [4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドにおける（ S ） - 2 - [3 - （ 2 - フルオロベンジル ） - 4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド及び（ S ） - 2 - [3 - （ 3 - フルオロベンジル ） - 4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドの定量限界（ L O Q ）値は 0 . 0 0 4 重量％である。対応する（ S ） - 2 - [4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩及び（ S ） - 2 - [4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩における（ S ） - 2 - [3 - （ 2 - フルオロベンジル ） - 4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩及び（ S ） - 2 - [3 - （ 3 - フルオロベンジル ） - 4 - （ 3 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩の定量限界（ L O Q ）値は 0 . 0 0 5 重量％である。検討する全不純物の検出限界値は 0 . 0 0 1 重量％である。

【実施例 1 8】

【 0 2 7 9 】

（ S ） - 2 - [4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミド（ラルフィナミド）メタンスルホン酸塩（ I d ）エナンチオマー純度の H P L C 測定

サンプルのエナンチオマー純度を H P L C により評価する。測定は以下の条件に従って実施する：

標準溶液 1：

（ R ） - 2 - [4 - （ 2 - フルオロベンジルオキシ ） ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩参照標準約 5 . 3 m g を移動相 2 5 m L に溶かす。

標準溶液 2 :

(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩参照標準約 8 . 0 m g と 0 . 2 m L の標準溶液 1 を移動相 5 0 m L に溶かす。

(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩の濃度に対して計算した (R) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩の濃度は約 0 . 5 % である。

【 0 2 8 0 】

試験溶液 1 及び 2 :

試験生成物約 8 . 0 m g を移動相 5 0 m L に溶かすものを 2 本調製する。

【 0 2 8 1 】

クロマトグラフィー条件 :

- カラム : Chiralpak WH 250 mm x 4 . 6 mm , 内径 5 μ m ;
- カラム温度 : 45 ;
- 移動相 : 0 . 25 mM CuSO₄ (CuSO₄ 約 40 m g を正確に計量し、水 1000 m L に溶かす) / MeOH 60 / 40 ;
- アイソクラティック溶出 ;
- 流速 : 1 . 0 m L / 分 ;
- 検出 : UV 230 nm ;
- 注入容量 : 10 μ l ;
- 試験時間 : 15 分。

【 0 2 8 2 】

手順 :

ブランク (移動相) を 1 回、標準溶液 2 を 2 回、試験溶液 1 及び 2 を 1 回分析し、

- 標準注入については、(R) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩面積百分率 RSD % が 2 . 0 % 未満であり ;
- 標準溶液とサンプル溶液の両者については、注入毎に主ピーク面積百分率が平均値 ± 0 . 1 % に含まれることを確認する。

(R) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミドメタンスルホン酸塩含量 (面積百分率) を 2 回の測定の平均として計算する。

【 0 2 8 3 】

保持時間 :

(S) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド保持時間は約 5 . 7 分である。

(R) - 2 - [4 - (2 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド相対保持時間は約 1 . 7 である。

【 実施例 19 】

【 0 2 8 4 】

(S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド (サフィナミド) メタンスルホン酸塩 (Ic) エナンチオマー純度の HPLC 測定

サンプルのエナンチオマー純度を HPLC により評価する。測定は以下の条件に従って実施する。

【 0 2 8 5 】

試験溶液 :

試験サンプル約 10 m g を移動相 10 m L に溶かす。

【 0 2 8 6 】

クロマトグラフィー条件 :

- カラム : Chiralpak WH 250 mm x 4 . 6 mm , 内径 10 μ m ;
- カラム温度 : 50 ;

- 移動相：0.25 mM CuSO₄；
- アイソクラティック溶出；
- 流速：1.0 mL / 分；
- 検出：UV 200 nm；
- 注入容量：10 µl；
- 試験時間：30分。

【0287】

手順：

試験溶液を注入し、エナンチオマーピーク応答を面積百分率として計算する。

(S) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド保持時間は約 9.2 分である。

(R) - 2 - [4 - (3 - フルオロベンジルオキシ) ベンジルアミノ] プロパンアミド相対保持時間は約 1.9 である。

【実施例 20】**【0288】**

チトクローム P450 アッセイ

CYP 代謝後に蛍光発光する特異的基質を使用して薬剤代謝に関与する最も重要な 5 種類のチトクローム P450 アイソフォーム (CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 及び CYP3A4) の阻害を測定した (Gentest Kit アッセイ)。

【0289】

インキュベーション / NADPH 再生用緩衝液を加える 96 ウェルプレートで化合物を試験した。特異的ヒト組換えアイソザイム及び基質を加え、37 °C で CYP1A2 / CEC は 15 分間、CYP2E1 / MFC は 40 分間、CYP2C9 / MFC は 45 分間、その他の CYP450 は 30 分間インキュベートした。

特異的基質としては、

3 - シアノ - 7 - エトキシクマリン (CYP2C19 及び CYP1A2)、
7 - メトキシ - 4 - トリフルオロメチルクマリン (CYP2C9)、
3 - [2 - (N, N - ジエチル - N - メチルアミノ) エチル] - 7 - メトキシ - 4 - メチルクマリン (CYP2D6)、
ベンジルフェニルクマリン (CYP3A4) を使用する。

【0290】

適切な発光 / 励起波長に設定した Victor プレートリーダー (Perkin Elmer) でプレートを読み取り、IC₅₀ (酵素活性を 50 % 阻害する濃度) を測定した。結果を表 1 及び 2 に報告する。

【実施例 21】**【0291】**

ヒト神経芽細胞腫細胞株 SH-SY-5Y における細胞毒性アッセイ

ゼロ時点において、96 ウェルプレートで DMEM 増殖培地 + 10 % 熱不活化 FBS + 2 mM L - グルタミン + 100 U / mL - 100 µg / mL ペニシリン / ストレプトマイシンに細胞 1.10⁴ 個 / cm² を播種した。

【0292】

サブコンフルエント増殖期で 72 時間後に培地を除去し、神経細胞培養用基礎培地 180 µl + 2 mM L - グルタミン (Life Technologies) 中で試験化合物 (20 µl, 少なくとも 5 種類の濃度で 3 回ずつ) の存在下又は不在下に細胞を 24 時間 37 °C でインキュベートした。

【0293】

インキュベーション後に Alamar Blue 色素 (Alamar Blue (TM) Assay Kit, Promega) 20 µl を細胞培養液に直接加える。

【0294】

10

20

30

40

50

4 時間後に、T e c a n S p e c t r a f l u o r プレートリーダーを使用して 5 3 0 n m 励起及び 5 9 5 n m 発光波長の蛍光を測定することにより細胞毒性を評価する。

【 0 2 9 5 】

処理前後に、I m a g e A n a l y z e r (I m a g e P r o P l u s , 5 . 1) に連動させた O l y m p u s I X 7 0 倒立型光学顕微鏡により培養液を顕微鏡モニターし、細胞形態を評価する。

【 0 2 9 6 】

死亡率の 5 0 % を誘発する濃度として結果を表 1 に報告する。

【実施例 2 2 】

【 0 2 9 7 】

トランスフェクトした C H O 細胞株における H E R G 電流

組換え H E R G チャネルを安定に発現する C H O 細胞で H E R G 電流の阻害を試験した。

【 0 2 9 8 】

H E R G 電流に及ぼす試験化合物の効果を評価するために、細胞を - 8 0 M v でクランプし、0 m V まで 5 秒間脱分極して H E R G 電流を活性化させ、- 5 0 m V まで 5 秒間再分極して H E R G テール電流を不活性化させる。この手順を周波数 0 . 0 6 H z で反復した。試験化合物暴露前後に再分極による電流振幅 (H E R G テール電流) を測定した。

【 0 2 9 9 】

外液灌流時間後に測定した H E R G テール電流振幅と試験化合物灌流時間後 (定常状態効果に達したとき) に測定した H E R G テール電流の振幅差を対照 H E R G テール電流で割った値として電流阻害を計算した。

【 0 3 0 0 】

薬剤濃度に対する緊張遮断をプロットすることにより薬剤濃度 - 阻害曲線を得る。ロジスティック式 : $y = A_2 + (A_1 - A_2) / [1 + (x / IC_{50})^p]$ に従って用量応答曲線を緊張遮断データにフィットさせる。A 1 及び A 2 は 0 及び 1 0 0 % 電流阻害に対応する固定値 0 及び 1 であり、x は薬剤濃度であり、I C ₅₀ は 5 0 % 電流阻害を生じる薬剤濃度であり、p は対応する勾配係数である。結果を表 1 に報告する。

【実施例 2 3 】

【 0 3 0 1 】

マウスにおける最大電気ショック試験 (M E S)

最大電気ショック試験 (M E S) は齧歯類モデルにおける抗癲癇薬のスクリーニングで広く使用されている。

【 0 3 0 2 】

動物及び装置 : 体重 2 5 g の雄性 C D 1 マウスを使用する。White ら (White H . S . , Woodhead J . H . , Franklin M . R . , Swinyard E . A . , and Wolf H . H . Antiepileptic Drugs (1 9 9 5) 4 t h e d . : 9 9 - 1 1 0 , Raven Press , Ltd . , New York) により記載されている手順に従った。Ugo Basile 電気痙攣発生器 (Model E C T U N I T 7 8 0 1) を使用し、対照動物の少なくとも 9 7 % で後肢緊張伸展応答を発生するために十分な電気刺激を与えた。刺激はクリップ電極を通してマウスの耳内に与えた (パルス時間 0 . 4 m s の 8 0 H z パルス列で 0 . 7 秒間 4 0 m A ショック) 。M E S 誘導の 1 5 ~ 6 0 分前に腹腔内又は経口投与した化合物の急性効果を試験し、ビヒクル対照群と比較した。各群 1 0 匹ずつ試験した。発作の後肢緊張伸展成分の完全な抑制を抗痙攣活性の指標とみなした。

【 0 3 0 3 】

本発明の化合物は用量 3 ~ 3 0 m g / k g で経口又は腹腔内投与した。

【 0 3 0 4 】

結果を表 3 及び 4 に保護の % として表す。

10

20

30

40

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 C	47/575	(2006.01)	C 0 7 C	47/575	
A 6 1 K	31/165	(2006.01)	A 6 1 K	31/165	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	25/08	(2006.01)	A 6 1 P	25/08	
A 6 1 P	25/16	(2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/24	(2006.01)	A 6 1 P	25/24	
A 6 1 P	25/06	(2006.01)	A 6 1 P	25/06	
A 6 1 P	25/04	(2006.01)	A 6 1 P	25/04	
A 6 1 P	25/18	(2006.01)	A 6 1 P	25/18	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	15/00	(2006.01)	A 6 1 P	15/00	
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00	
A 6 1 P	1/00	(2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
C 0 7 B	61/00	(2006.01)	C 0 7 B	61/00	3 0 0

(74)代理人 100062007

弁理士 川口 義雄

(72)発明者 バルバンティ, エレナ

イタリア国、イ - 2 0 0 9 3 ・コロニヨ・モンツエーゼ、ピア・デイ・プラタニ、6

(72)発明者 カッチア, カルラ

イタリア国、イ - 2 1 0 1 0 ・カルダノ・アル・カンポ、ピア・ログラツツア・2 9 / ディー

(72)発明者 サルバツティ, パトリシア

イタリア国、イ - 2 0 0 2 0 ・アレーゼ、ピア・バレーラ、1 6 ・チ

(72)発明者 ベラルデイ, フランチェスコ

イタリア国、イ - 2 8 0 6 2 ・カーメリ、ストラダ・ブプリバータ、マスカーニ・2 1

(72)発明者 ルフィリ, テイツイアーノ

イタリア国、イ - 1 3 8 5 6 ・ピリアーノ・ピエツレーゼ、コルソ・アービルアナム・8 7 ・チ

(72)発明者 ボゴーニヤ, ルイジイ

イタリア国、イ - 2 8 0 1 0 ・パプリオ・ダゴーニヤ、ピア・チ、バツテイスティ・1 0 ・チ

審査官 今井 周一郎

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 1 0 2 3 0 0 (WO, A 1)

特表 2 0 0 6 - 5 1 5 3 2 6 (JP, A)

特表 2 0 0 5 - 5 0 4 7 8 2 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 C 2 3 1 / 1 2

C 0 7 C 2 3 7 / 0 6

C 0 7 C 2 5 1 / 2 4

C 0 7 C 2 4 9 / 0 2

C 0 7 C 4 5 / 6 5

C 0 7 C 4 7 / 5 7 5

CA / REGISTRY (STN)