

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2019-142902

(P2019-142902A)

(43) 公開日 令和1年8月29日(2019.8.29)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C O 7 D 513/04 (2006.01)	C O 7 D 513/04 3 7 5	4 C O 7 2
A 6 1 K 31/542 (2006.01)	C O 7 D 513/04 C S P	4 C O 8 6
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 K 31/542	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 有 請求項の数 9 O L 外国語出願 (全 46 頁)		

(21) 出願番号	特願2019-74951 (P2019-74951)	(71) 出願人	594197872
(22) 出願日	平成31年4月10日 (2019.4.10)		イーライ リリー アンド カンパニー
(62) 分割の表示	特願2017-540253 (P2017-540253) の分割		アメリカ合衆国 インディアナ州 4 6 2
原出願日	平成28年1月22日 (2016.1.22)		8 5 インディアナポリス リリー コー
(31) 優先権主張番号	62/109,733	(74) 代理人	100092783
(32) 優先日	平成27年1月30日 (2015.1.30)		弁理士 小林 浩
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100176094
			弁理士 箱田 満
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 N- [3- [(4 a R, 7 a S) -2-アミノ-6- (5-フルオロピリミジン-2-イル) -4, 4 a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-D] [1, 3] チアジン-7 a-イル] -4

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 医薬処方物の製剤及び製造における有用性を高めるための、固形状態の安定性、及び化学的な安定性が改善された新規の形態の N- [3- [(4 a R, 7 a S) -2-アミノ-6- (5-フルオロピリミジン-2-イル) -4, 4 a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7 a-イル] -4-フルオロフェニル] -5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの提供。

【解決手段】 N- [3- [(4 a R, 7 a S) -2-アミノ-6- (5-フルオロピリミジン-2-イル) -4, 4 a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7 a-イル] -4-フルオロフェニル] -5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩である化合物。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩である化合物。

【請求項 2】

結晶質である請求項 1 に記載のトシル酸塩。

【請求項 3】

0. 2 度の回析角に対する許容誤差で、19. 6°、13. 8°、及び18. 5°からなる群から選択されるピークのうち1つ以上と組み合わせて、5. 0°の回析角 2 シータでの X 線回析スペクトラムにおける実質的なピークにより特徴づけられる、請求項 1 または 2 のいずれかに記載のトシル酸塩。

10

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物の有効量を、かかる治療を必要としている患者に投与することを含む、患者のアルツハイマー病を治療する方法。

【請求項 5】

請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物の有効量を、かかる治療を必要としている患者に投与することを含む、患者の軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行を治療する方法。

20

【請求項 6】

治療における使用のための、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 7】

アルツハイマー病の治療における使用のための、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 8】

軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行の治療における使用のための、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物。

【請求項 9】

1 つ以上の薬剂的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤と、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の化合物を含む、医薬組成物。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトルエンスルホン酸（トシル酸）塩、当該トシル酸塩を含有する医薬組成物、生理学的障害を治療するための当該トシル酸塩の使用法、ならびにその合成に有用な中間体及び方法に関する。

40

【背景技術】

【0002】

本発明は、アルツハイマー病、ならびにアミロイド前駆体タンパク質（APP：amyloid precursor protein）の神経毒性があり高度に凝集性のペプチド断片であるアミロイドβ（Aβ）ペプチドが関与する他の疾患及び障害の治療分野に関する。アルツハイマー病は、世界で数百万人の患者が罹患している破壊的な神経変性疾患である。現在承認されている市販薬は患者に一過性で対症療法的な効果しかもたっていないことを鑑みると、アルツハイマー病の治療には大きなアンメットニーズが存在する。

【0003】

50

アルツハイマー病は脳内のAベータの生成、凝集、及び沈着により特徴づけられる。 β -セクレターゼ (BACE: アミロイド前駆体タンパク質 β サイト切断酵素: β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme) の完全阻害または部分阻害は、マウスモデルにおいてプラーク関連の病態またはプラーク依存性の病態に対して著しい効果を有することが示されていることから、Aベータペプチド値のわずかな低下であっても、プラーク量及びシナプス障害に長期間の大幅な低減をもたらし得、特にアルツハイマー病の治療において多大な治療利益をもたらし得ることが示唆される。

【0004】

米国特許第8,841,293号は、たとえばアルツハイマー病などのAベータペプチド介在性障害の治療のための特定のBACE阻害剤を開示しており、特にBACE阻害剤のN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド、及びその対応する塩酸塩を開示している。

【発明の概要】

【0005】

医薬処方物の製剤及び製造における有用性を高めるために、固形状態の安定性、及び化学的な安定性が改善された新規の形態のN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドが所望されている。したがって、本発明は、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩を提供するものである。さらに、本発明は結晶質であるN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩を提供するものである。本発明はさらに、回析角に対し0.2°の許容誤差で、19.6°、13.8°、及び18.5°からなる群から選択されるピークのうちの1つ以上と組み合わせられた、5.0°の回析角2シータでのX線回析スペクトルの実質的なピークにより特徴づけられる、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩を提供するものである。

【0006】

本発明はまた、有効量のN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩を、かかる治療を必要としている患者に投与することを含む、患者のアルツハイマー病を治療する方法を提供する。本発明はさらに、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩の有効量を、かかる治療を必要としている患者に投与することを含む、患者の軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行を治療する方法を提供する。本発明はまた、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのト

シル酸塩の有効量をかかるとして治療を必要としている患者に投与することを含む、患者においてBACEを阻害する方法を提供する。本発明はまた、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩の有効量をかかるとして治療を必要としている患者に投与することを含む、アミロイド前駆タンパク質のBACE介在性切断を阻害する方法を提供する。本発明はさらに、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩の有効量をかかるとして治療を必要としている患者に投与することを含む、Aベータペプチドの産生を阻害する方法を提供する。

10

【0007】

さらに本発明は、治療、特にアルツハイマー病の治療、または軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行の治療における使用のためのN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩を提供する。さらに本発明は、アルツハイマー病の治療のための医薬品の製造、または軽度認知機能障害のアルツハイマー病への進行の治療のための医薬品の製造のためのN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩の使用を提供する。

20

【0008】

さらに本発明は、回析角に対し0.2°の許容誤差で、19.6°、13.8°、及び18.5°からなる群から選択されるピークのうちの1つ以上と組み合わせられた、5.0°の回析角2シータでのX線回析スペクトルの実質的なピークにより特徴づけられる、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩の有効量を、かかるとして治療を必要としている患者に投与することを含む、患者のアルツハイマー病を治療する方法を提供する。本発明はまた、治療、特にアルツハイマー病の治療、または軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行の治療における使用のための、回析角に対し0.2°の許容誤差で、19.6°、13.8°、及び18.5°からなる群から選択されるピークのうちの1つ以上と組み合わせられた、5.0°の回析角2シータでのX線回析スペクトルの実質的なピークにより特徴づけられる、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩を提供する。さらに本発明は、アルツハイマー病の治療のための医薬品の製造、または軽度認知機能障害のアルツハイマー病への進行の治療のための医薬品の製造のための、回析角に対し0.2°の許容誤差で、19.6°、13.8°、及び18.5°からなる群から選択されるピークのうちの1つ以上と組み合わせられた、5.0°の回析角2シータでのX線回析スペクトルの実質的なピークにより特徴づけられる、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩を提供する。

30

40

【0009】

本発明はさらに、1つ以上の薬剤的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤と、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)

50

ー4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]ー4-フルオロフェニル]ー5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩を含有する医薬組成物を提供する。本発明はまた、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]ー4-フルオロフェニル]ー5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩の合成のための新規の中間体及び方法を包含する。

【発明を実施するための形態】

【0010】

軽度認知機能障害は、臨床所見、及び軽度認知機能障害を示す患者が徐々にアルツハイマー型認知症へと進行することに基づいた、アルツハイマー病に関連した認知症の潜在的な前駆期として定義されている。(Morris, et al., Arch. Neurol., 58, 397-405 (2001)); Petersen, et al., Arch. Neurol., 56, 303-308 (1999))。「軽度認知機能障害のアルツハイマー病への進行の治療」という用語は、患者において、軽度認知機能障害がアルツハイマー病へと進行することを遅延させること、食い止めること、または回復にむかわせることを含む。

10

【0011】

本明細書において用いられる場合、「治療すること」(treating、またはtreat)という用語は、既存の症状もしくは障害の進行または重症度を抑えること、遅延させること、食い止めること、または回復にむかわせることを含む。

20

【0012】

本明細書において用いられる場合、「患者」という用語は、ヒトを指す。

【0013】

「Aベータペプチド生成の阻害」という用語は、患者において、Aベータペプチドのin vivoレベルの低下を意味すると解釈される。

【0014】

本明細書において用いられる場合、「有効量」という用語は、診断を受けた患者または治療を受けている患者において、当該患者への単回投与または反復投与により所望される効果をもたらす、本発明化合物もしくはその薬剂的に許容可能な塩の量または投与量を指す。

30

【0015】

有効量は、公知の技術を使用することにより、及び類似した環境下で得られた結果を観察することにより、当業者としての担当診断医によって容易に決定することができる。患者の有効量の決定において、限定されないが、患者の種；大きさ、年齢、及び一般健康状態；関与する具体的な疾患または障害；疾患もしくは障害の程度、または関与、または重症度；個々の患者の反応性；投与される特定の化合物；投与方法；投与される製剤のバイオアベイラビリティの特徴；選択される用法；併用薬の使用；及び他の関連状況をはじめとする多くの因子が担当診断医により考慮される。

【0016】

本発明の化合物は、一般的に広範な用量域で有効である。たとえば、1日当たりの用量は通常、約0.01～約20mg/体重kgの範囲内にある。一部の例において、前述の範囲の下限値を下回る用量レベルがより適切である場合もあり、一方で他の場合においては、許容可能な副作用と共にさらに多量の投与量が用いられる場合がある。従って、上述の用量域は決して本発明の範囲を限定することを意図していない。

40

【0017】

本発明化合物は、好ましくは、経口、経皮、及び非経口の経路をはじめとする、化合物が生体利用可能となる任意の経路により投与される医薬組成物として製剤化される。最も好ましくは、かかる組成物は経口投与用、または経皮投与用であり、経口投与が特に好ましい。かかる医薬組成物、及び同組成物の製剤方法は当分野に周知である。(たとえばRemington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition,

50

Lippincott, Williams & Wilkins, 2006を参照のこと)。

【0018】

N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩は、本発明の治療方法に特に有用であるが、特定の形態が好ましい。以下の段落にかかる形態を記載する。これら好ましい実施形態は、本発明の医薬組成物、治療方法、及び新規化合物に適用可能であることが理解されるであろう。

【0019】

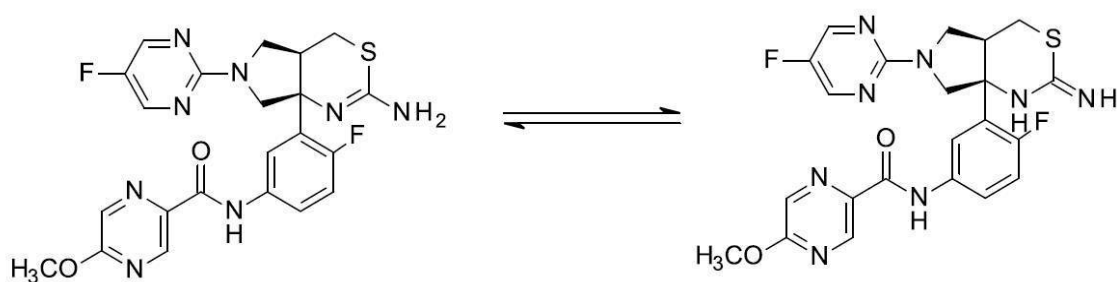
回析角に対し0.2°の許容誤差で、19.6°、13.8°、及び18.5°からなる群から選択されるピークのうちの1つ以上と組み合わせられた、5.0°の回析角2シータでのX線回析スペクトルの実質的なピークにより特徴づけられる、N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの結晶トシル酸塩が特に好ましい。

【0020】

当業者は、N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドが、スキームAに示される互変異性体で存在し得ることを認識するであろう。本明細書において、N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの特定の互変異性体のうちの1つに何らかの言及がされた場合、互変異性体及びそれらのすべての混合物の両方が包含されることを理解されたい。

スキームA

【化1】



【0021】

さらに、以下のスキームに記載される特定の間体は、1つ以上の窒素保護基を含有してもよい。その可変保護基は、実施される特定の反応条件及び特定の変換に依存して、各場合で同じであっても、異なってもよい。保護条件及び脱保護条件は、当業者には周知であり、文献中に記載されている（例えば、“Greene’s Protective Groups in Organic Synthesis”, Fourth Edition, by Peter G.M. Wuts and Theodora W. Greene, John Wiley and Sons, Inc. 2007を参照のこと）。

【0022】

明確性を目的として、以下のスキームにおいて、ある立体化学中心は特定されないままであり、ある置換基は省略されているが、決して当該スキームの教示を限定することは意図されていない。さらに個々の異性体、鏡像異性体、及びジアステレオマーは、本発明化合物の合成における任意の都合のよいポイントで、たとえば選択的結晶化技術またはキラ

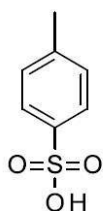
ルクロマトグラフィーなどの方法により、当業者により分離または分割されてもよい（たとえば、J. Jacques, et al., "Enantiomers, Racemates, and Resolutions", John Wiley and Sons, Inc., 1981、及びE.L. Eliel and S.H. Wilen, "Stereochemistry of Organic Compounds", Wiley-Interscience, 1994を参照のこと）。「異性体 1」及び「異性体 2」という記号はそれぞれ、キラルクロマトグラフィーから 1 番目、及び 2 番目に溶出する化合物を指し、キラルクロマトグラフィーが合成の早い段階で開始された場合、この同じ記号が、引き続く中間体及び実施例にも適用される。

【0023】

以下のように、いくつかの略語を定義する。「アセトニトリル」とは、ACNを指す。「APP」とは、アミロイド前駆タンパク質を指す。「CSF」とは、脳脊髄液を指す。「DCM」とは、ジクロロメタンを指す。「DIPEA」とは、ジイソプロピルエチルアミン、N-エチル-N-イソプロピルプロパン-2-アミン、またはN, N-ジイソプロピルエチルアミンを指す。「DMEM」とは、ダルベッコ変法イーグル培地を指す。「DMF」とは、ジメチルホルムアミドを指す。「DMSO」とはジメチルスルホキシドを指す。「EDCI」とは、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩を指す。「ee」とは、鏡像体過剰率を指す。「EtOAc」とは、酢酸エチルを指す。「Ex」とは、実施例を指す。「F12」とは、ハムF12培地を指す。「FBS」とは、ウシ胎児血清を指す。「FRET」とは、蛍光共鳴エネルギー移動を指す。「HEK」とは、ヒト胎児腎細胞を指す。「HOAc」とは、酢酸を指す。「HOBt」とは、1-ヒドロキシルベンゾトリアゾール水和物を指す。「HPLC」とは、高速液体クロマトグラフィーを指す。「IC₅₀」とは、その剤に可能な最大阻害反応の50%を生じさせる薬剤の濃度を指す。「min」とは、分（複数含む）を指す。「MTBE」とは、メチルtert-ブチルエーテルを指す。「PDAPP」とは、血小板由来アミロイド前駆タンパク質を指す。「Prep」とは、製造を指す。「RFU」とは、相対蛍光単位を指す。「SCX」とは、強カチオン交換を指す。「R_t」とは、保持時間を指す。及び「THF」とは、テトラヒドロフランを指す。

【0024】

当業者は、「トシル酸」、「トルエンスルホン酸」、「p-トルエンスルホン酸」、及び「4-メチルベンゼンスルホン酸」という用語が、以下の構造の化合物を指すことを理解している。



【0025】

したがって、当業者は、本明細書において、以下の名称のいずれかに対する言及が、以下の構造の塩を指すことを理解している：

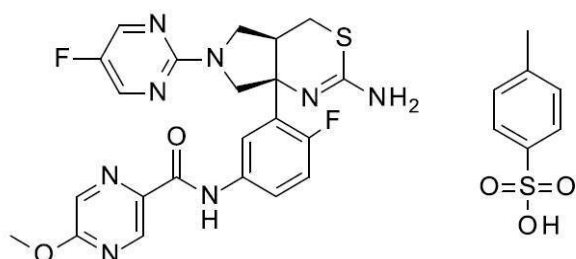
「N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩」、

「N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド；トルエンスルホン酸」、

「N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド；p-トルエンスルホン酸」、及び

「N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド；4-メチルベンゼンスルホン酸」。

【化3】



10

【0026】

N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩は、当分野に公知の様々な方法により製造することができ、そのうちのいくつかを以下の製造及び実施例において例示する。さらに、N-〔3-〔(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-7a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの遊離塩基、及びその対応するHCl塩は、米国特許第8, 841, 293号に記載されるように、当業者により製造することができる。記載されている各経路の特定の製造工程は、異なる方法で組み合わせられてもよく、または本発明化合物を製造するための異なる製造からの工程と併合されてもよい。各工程の生成物は、抽出、蒸発、沈殿、クロマトグラフィー、ろ過、粉碎、または結晶化をはじめとする当分野で周知の標準的な方法により回収することができる。試薬及び出発物質は当業者が容易に入手可能である。

20

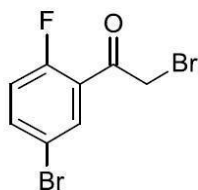
30

【0027】

製造1

2-ブロモ-1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)エタノン

【化4】



40

N-ブロモスクシンイミド(984 g、5.53モル)を、1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)エタノン(1000 g、4.6モル)及びp-トルエンスルホン酸(1315 g、7.64モル)のDCM溶液(7 L)に35℃で分割して加える。混合物を攪拌し、4時間、40℃に加熱する。混合物を24℃まで冷却し、7%NaHCO₃(5 L)を添加する。層を分離させ、有機層を10%Na₂SO₃(5 L)及び水(5 L)を

50

用いて洗浄する。有機層を2～3体積まで濃縮し、表題化合物を得て、それをさらなる精製を行うことなく用いる。

【0028】

別の製造1

1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)エタノン(80g、0.37mol)をDCM(800mL)に溶解し、10℃まで冷却する。臭素(63g、0.39mol)を、5時間かけてゆっくりと添加する。30分後、追加の臭素(3.5g、0.06mol)を添加する。30分後、混合物を室温まで加温し、有機層を、NaCl水溶液(500mL)とNaHCO₃水溶液(400mL)の混合溶液を用いて洗浄する。有機層を、NaHCO₃水溶液(400mL)、NaHSO₃水溶液(2×400mL)、及びNaCl水溶液を用いて連続的に洗浄する。有機層を乾燥させ(Na₂SO₄)、濃縮して残留物を得る。この残留物を、DCM(100mL)と石油エーテル(500mL)の混合溶液中に溶解する。この溶液を0.5時間、-50℃に冷却し、固形物をろ過により集め、表題化合物を得る(84g、77%)。¹H NMR (CDCl₃) δ 4.46 (d, 2H), 7.07 (dd, 1H), 7.66 (m, 1H), 8.02 (dd, 1H)。

10

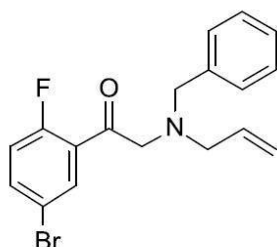
【0029】

製造2

2-[アリル(ベンジル)アミノ]-1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)エタノン

【化5】

20



2-ブロモ-1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)エタノン(25.1g、84.8ミリmol)を、N-ベンジルプロパ-2-エン-1-アミン(15.0g、102ミリmol)のトルエン(200mL)及びDIPEA(59mL、338ミリmol)の溶液に室温で添加する。この混合物の表面下に窒素をスパーキングしながら、10分間、室温で攪拌することにより、この混合物を脱酸素化する。反応物を40℃まで加熱し、2.5時間攪拌し、次いで追加のN-ベンジルプロ-2-エン-1-アミン(2.0g、13.6ミリmol)を添加する。反応物を4.5時間、40℃で攪拌し、その後室温まで冷却する。この物質を、さらに精製を行うことなく使用する。この溶液を、以下のパラメータを使用するHPLCにより、表題化合物に関して解析する：LCカラム：Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC (登録商標)) C8 2.1×100mm 1.7μm；移動相A：TFA(4mL)とACN(10mL)を水(4L)に添加することにより調製される0.1%(vol/vol)TFA水溶液+0.2%ACN(vol/vol)、移動相B：TFA(4mL)をACN(4L)に添加することにより調製される0.1%TFAのACN溶液。勾配：%A=10分間にわたり、95%～53.1%、流速0.85mL/分、カラム温度：45℃。R_t=6.43分(UV)。

30

40

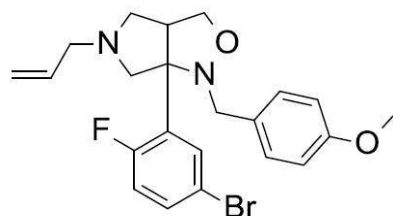
【0030】

製造3

5-アリル-6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-1-[(4-メトキシフェニル)メチル-3,3a,4,6-テトラヒドロピロロ[3,4-c]イソキサゾール

50

【化 6】



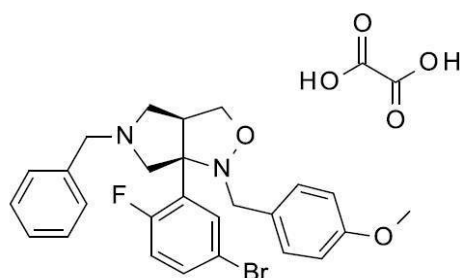
2-ブロモ-1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)エタノン(1363g、4.61モル)のトルエン溶液(10L)に、ジアリルアミン(537g、5.53モル)及びDIPEA(2381g、18.42モル)を添加する。この混合物を40℃で4時間攪拌し、単離されていない1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-2-(ジアリルアミノ)エタノンを得る。粗1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-2-(ジアリルアミノ)エタノンを含むこの混合物に、N-(4-メトキシベンジル)ヒドロキシルアミン(847g、5.53モル)とチタン(IV)イソプロポキシド(1965g、6.91モル)を添加する。この混合物を90℃で2時間攪拌する。この混合物を20℃まで冷却し、50%クエン酸一水和物(4L)と飽和Na₂CO₃(4L)を加える。層を分離させ、MTBE(5L)を用いて水層を抽出する。有機抽出物を、水(5L)で洗浄し、珪藻土を通してろ過し、乾燥するまで濃縮する。この残留物にEtOAc(10L)及びシュウ酸(580g)を加え、固形物をろ過し、1N NaOH(13L)に加える。MTBE(5L)を加え、この混合物を、珪藻土を通してろ過する。層を分離させ、有機層を2体積まで濃縮する。ヘプタン(3L)を加え、溶液を10℃まで冷却する。得られた固形物をろ過し、表題化合物を得る(1330g、64%)。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 2.51-2.49(m, 3H), 3.09-3.04(m, 3H), 3.78-3.41(m, 6H), 4.01(m, 1H), 5.24-5.01(m, 2H), 5.89-5.85(m, 1H), 6.82-6.80(m, 2H), 7.51-7.13(m, 3H), 7.63-7.62(m, 1H), 7.65-7.64(m, 1H)。

【0031】

製造 4

相対-(3aR, 6aS)-5-ベンジル-6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-1-[(4-メトキシフェニル)メチル]-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ[3, 4-c]イソキサゾール、シュウ酸

【化 7】



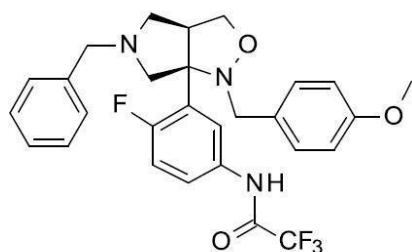
N-[(4-メトキシフェニル)メチル]ヒドロキシルアミン(15.5g、101ミリモル)を、2-[アリル(ベンジル)アミノ]-1-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)エタノンの溶液に40℃に加え、次いでチタン(IV)イソプロポキシド(50.3mL、169ミリモル)を加えた。この混合物を5分間、システムを通して窒素をスパージングすることにより脱酸素化する。この混合物を攪拌しながら2時間、90℃まで加熱する。この反応混合物をクエン酸(36g、186ミリモル)の水溶液(36g)を用いて洗浄し、室温で30分間攪拌する。飽和水溶液として炭酸ナトリウム(100g、939ミリモル)を加え、pHをおよそ9に調節する。この混合物を必要に応じて水及び

トルエンで希釈し、層を分離させる。トルエンの層を水（200 mL）で希釈したHClの水溶液（5.1 mLの5N HCl）、次いで水（200 mL）を用いて洗浄する。トルエン層を粘性のある油状物にまで濃縮する。この油状物をEtOAc（375 mL）に溶解し、EtOAc（375 mL）に溶解させたシュウ酸（15.4 g、169ミリモル）の溶液を室温で攪拌しながら滴下して加える。この混合物を2日間室温で攪拌し、ろ過し、生成物のケーキをEtOAc（250 mL）で洗浄する。固形物を40℃、真空内で一晚乾燥させ、シスラセミ混合物（41.7 g、84%）として表題化合物を得る。ES/MS（m/z）：498（M+H）。

【0032】

製造 5

相対N-〔3-〔（3aR, 6aS）-5-ベンジル-1-〔（4-メトキシフェニル）メチル〕-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ〔3, 4-c〕イソキサゾール-6a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-2, 2, 2-トリフルオロアセトアミド
【化8】



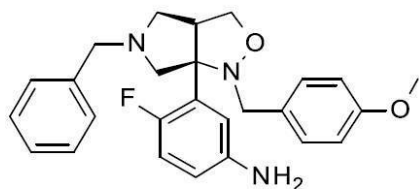
相対-（3aR, 6aS）-5-ベンジル-6a-（5-ブロモ-2-フルオロフェニル）-1-〔（4-メトキシフェニル）メチル〕-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ〔3, 4-c〕イソキサゾール、シュウ酸（23.6 g、40.2ミリモル）を、DCM（400 mL）と5N NaOH水溶液（200 mL）の混合溶液に加える。この混合物を10分間攪拌し、次いで層を分離させる。有機層を濃縮して、相対-（3aR, 6aS）-5-ベンジル-6a-（5-ブロモ-2-フルオロフェニル）-1-〔（4-メトキシフェニル）メチル〕-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ〔3, 4-c〕イソキサゾール（20.0 g、40.2ミリモル）を得る。この物質をジメチルスルホキシド（360 mL）、2, 2, 2-トリフルオロアセトアミド（7.8 g、68ミリモル）、ヨウ化ナトリウム（10.3 g、68.6ミリモル）、炭酸カリウム（9.54 g、68.3ミリモル）、（1R, 2R）-N, N'-ジメチル-1, 2-シクロヘキサジアミン（4.7 g、32ミリモル）、及びヨウ化銅（I）（1.53 g、8.03ミリモル）へと加える。この混合物を10分間、システムを通して窒素をスパーミングすることにより脱酸素化する。この混合物を115℃まで加熱し、5.5時間攪拌し、室温まで冷却する。EtOAc（250 mL）及び水（200 mL）を加え、得られた混合物を10～15分間攪拌する。層を分離させ、EtOAc（200 mL）を用いて水層を逆抽出する。混合有機層を、塩化アンモニウム20wt%水溶液（100 mL）、次いで塩化リチウム20wt%水溶液（100 mL）及び水（100 mL）を用いて洗浄する。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥させ、ろ過し、乾固するまで濃縮し、シスラセミ混合物として粗表題化合物を得る（23.6 g、111%）。ES/MS（m/z）：530（M+H）。

【0033】

製造 6

相対-3-〔（3aR, 6aS）-5-ベンジル-1-（4-メトキシフェニル）メチル〕-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ〔3, 4-c〕イソキサゾール-6a-イル〕-4-フルオロアニリン

【化 9】



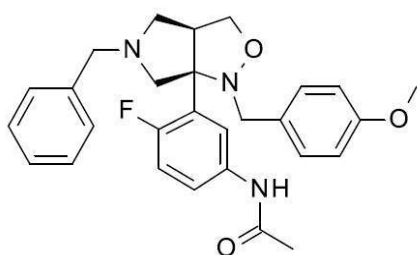
相対N-〔3-〔(3aR, 6aS)-5-ベンジル-1-〔(4-メトキシフェニル)メチル〕-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ〔3, 4-c〕イソキサゾール-6a-イル〕-4-フルオロフェニル〕-2, 2, 2-トリフルオロアセトアミド (21.0 g、39.7ミリモル) をメタノール (250 mL)、5 N NaOH水溶液 (105 mL)、及びエタノール (105 mL) に加え、得られた混合物を2時間、50℃に加熱する。反応混合物を減圧下、35～40℃で濃縮し、メタノールとエタノールを除去する。この物質を、MTBE (320 mL) と水 (300 mL) の混合溶液中に溶解する。層を分離させ、有機層を水 (100 mL)、次いで水 (400 mL) と12 N HCl水溶液 (3.5 mL) の混合溶液で洗浄する。水層を、MTBE (400 mL)、水 (100 mL)、及び5 N NaOH水溶液 (25 mL) の混合溶液に加え、層を分離させる。水層をMTBE (100 mL) で洗浄する。有機層を1つにまとめ、硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過し、真空内で濃縮して、シスラセミ混合物として表題化合物を得る (9.8 g、57%)。ES/MS (m/z) : 435 (M+H)。

【0034】

製造 7

相対-N-3-〔(3aR, 6aS)-5-ベンジル-1-〔(4-メトキシフェニル)メチル〕-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ〔3, 4-c〕イソキサゾール-6a-イル〕-4-フルオロフェニル〕アセトアミド

【化 10】



相対-3-〔(3aR, 6aS)-5-ベンジル-1-(4-メトキシフェニル)メチル〕-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ〔3, 4-c〕イソキサゾール-6a-イル〕-4-フルオロアニリン (9.4 g、22ミリモル) をDCM (110 mL)、4-ジメチルアミノピリジン (0.08 g、0.65ミリモル)、及びトリエチルアミン (6.1 mL、43ミリモル) に加え、反応物を0℃に冷却する。この溶液に無水酢酸 (3.4 g、33ミリモル) を滴下して加える。反応物を室温まで加温し、2時間攪拌する。反応物に水 (140 mL) を加え、混合物を室温で10分間、攪拌する。層を分離させ、水層をDCM (100 mL) で洗浄する。混合有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過し、濃縮してシスラセミ混合物として表題化合物を得る (10.1 g、100%)。ES/MS (m/z) : 477 (M+H)。

【0035】

製造 8

5-アリル-6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-3, 3a, 4, 6-テ

トラヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]イソキサゾール塩酸塩
【化11】



10

TFA (4 L、52.9 モル) を、5-アリル-6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-1-[(4-メトキシフェニル)メチル-3,3a,4,6-テトラヒドロピロロ[3,4-c]イソキサゾール (1990 g、4.45 モル) のDCM 溶液 (12 L) に、温度が35℃未満に維持される速度で滴下して加える。添加が完了した後、混合物を33~43℃に加温し、6時間攪拌する。NaOH (20%、10 L) を、温度が35℃未満に維持される速度で添加する。層を分離させ、有機層を水 (6 L) で洗浄する。溶液を濃縮し、エタノール (16 L) を添加し、混合物を、珪藻土を通してろ過する。ろ液を濃縮し、EtOAc (10 L) を加える。4M HCl のEtOAc 溶液 (8 L) を加え、得られた固形物をろ過し、乾燥させて表題化合物を得る (1385 g、85.6%)。ES/MS (m/z) : 327.1 (M+H)。

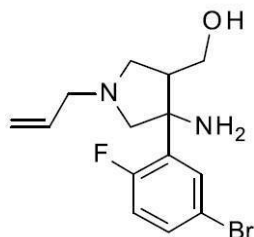
20

【0036】

製造9

[1-アリル-4-アミノ-4-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メタノール

【化12】



30

5-アリル-6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-3,3a,4,6-テトラヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]イソキサゾール塩酸塩 (1400 g、3.85 モル) のDCM 溶液 (7 L) に、pH>9となるよう炭酸ナトリウムの飽和水溶液を加える。層を分離させ、有機抽出物を1.5体積まで濃縮する。HOAc (1.38 L) を加え、溶液を2 Lまで濃縮する。HOAc (7 L) 及び亜鉛粉末 (2.5 kg、38.5 モル) を加え、混合物を40~50℃に加熱し、3時間攪拌する。EtOAc (9.8 L) を加え、混合物を、珪藻土を通してろ過する。ろ過ケーキをEtOAc (4 L) で洗浄する。ろ液を分離させ、水 (7 L) を混合有機物に加える。水酸化アンモニウムを、pH≥9になるように加える。層を分離させ、有機層を2 Lまで濃縮する。エタノール (2.8 L) を加え、溶液を2 Lまで濃縮する。エタノール (19 L) を加え、混合物を、珪藻土を通してろ過し、表題化合物のエタノール溶液を得て、それをさらなる精製を行わずに使用する。

40

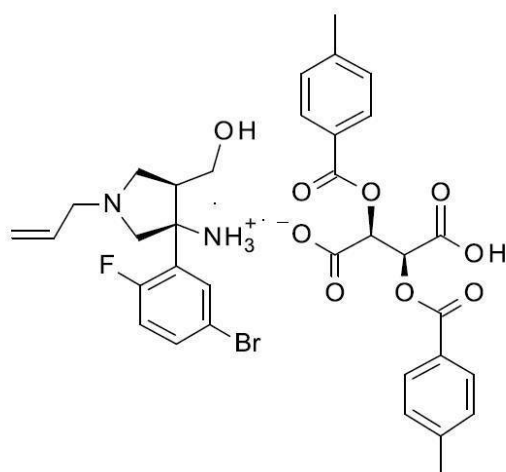
【0037】

製造10

[(3S,4R)-1-アリル-3-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-3-イル]アンモニウム;(2S,3S)-4-ヒド

50

ロキシ-2, 3-ビス [(4-メチルベンゾイル) オキシ] -4-オキソブタン酸塩
【化13】



10

ジ-*p*-トルオイル-L-酒石酸-水和物 (1.04 kg、2.69 モル) を、[1-アリル-4-アミノ-4-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メタノール (1264 g、3.85 ミリモル) のエタノール溶液 (21 L) に加える。混合物を 65~75℃ に加熱し、3 時間攪拌する。混合物を 5~10℃ に冷却し、[(3*S*, 4*R*)-1-アリル-3-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-3-イル]アンモニウム; (2*S*, 3*S*)-4-ヒドロキシ-2, 3-ビス [(4-メチルベンゾイル) オキシ] -4-オキソブタン酸塩の種晶 (1.0 g) を加え、混合物を 3 時間攪拌する。固形物をろ過し、ろ過ケーキを冷エタノール (1.4 L) で洗浄する。ろ過ケーキを乾燥し、白色固形物として表題化合物を得る。第二の溶出異性体のキラル解析: カラム: IC Chiralpak、4.6 mm×250 mm×5 μm; 溶離液: 90% ヘキサン (0.3% ジエチルアミン): 10% エタノール (0.3% ジエチルアミン); 流速 1.0 mL/分、UV 270 nm によって、鏡像異性的に富化された (99% ee)、 $R_t = 7.4$ 分の鏡像異性体を確認する。¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 2.40 (s, 6H), 3.05-3.04 (m, 1H), 3.57-3.31 (m, 3H), 3.66-3.58 (m, 4H), 3.75-3.74 (m, 2H), 5.38-5.36 (m, 1H), 5.50-5.46 (m, 1H), 5.88 (s, 2H), 5.97-5.91 (m, 1H), 7.10-7.05 (m, 1H), 7.29 (d, *J*=8.0 Hz, 4H), 7.53-7.51 (m, 1H), 7.80-7.78 (m, 1H), 8.01 (d, *J*=8.0 Hz, 4H)。

20

30

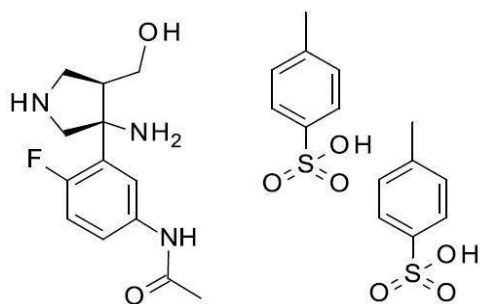
【0038】

製造11

相対-1-[3-[(3*S*, 4*R*)-3-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-3-イル]-4-フルオロフェニル]プロパン-2-オン、ジ-*p*-トルエンスルホン酸

40

【化 1 4】



10

相対-N-3-[(3aR, 6aS)-5-ベンジル-1-[(4-メトキシフェニル)メチル]-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ[3, 4-c]イソキサゾール-6a-イル]-4-フルオロフェニル]アセトアミド(5.0g、11.0ミリモル)を、水(75mL)、10%パラジウム炭素(2.5g、23ミリモル)、p-トルエンスルホン酸(5.0g、26ミリモル)、及びエタノール(75mL)に加え、混合物を、20時間、室温で50psiの水素雰囲気下、水素化する。混合物を、珪藻土を通してろ過し、パッドをエタノール(100mL)、次いでDCM(100mL)で洗浄する。ろ液を濃縮し、定量粗収率(8.1g、>100%)で、シスラセミ混合物として表題化合物を得る。この材料をさらなる精製を行うことなく直接使用する。ES/MS(m/z): 268(M+H)。

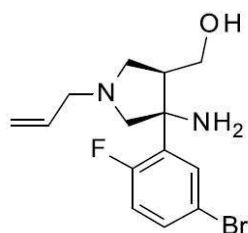
20

【0039】

製造12

((3R, 4S)-1-アリル-4-アミノ-4-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル)メタノール

【化 1 5】



30

1N HCl(500mL、500ミリモル)を、[(3S, 4R)-1-アリル-3-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-3-イル]アンモニウム;(2S, 3S)-4-ヒドロキシ-2, 3-ビス[(4-メチルベンゾイル)オキシ]-4-オキソブタン酸塩(100g、139.4ミリモル)の0℃のEtOAc溶液(500mL)に加える。この混合物を1時間攪拌する。水層を分離させ、pHを、1N NaOHを用いて8に調節する。水層を、EtOAc(350mL×2)を用いて抽出する。有機層を混合し、水(500mL)で洗浄し、濃縮して表題化合物を得る(40g、87%)。第二の溶出異性体のキラル解析:カラム:IC Chiralpak、4.6mm×250mm×5μm;溶離液:90%ヘキサン(0.3%ジエチルアミン):10%エタノール(0.3%ジエチルアミン);流速1.0mL/分、UV270nmによって、鏡像異性的に富化された(99.7%ee)、R_t=7.4分の鏡像異性体を確認する。¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 2.78-2.70(m, 5H), 3.16-3.00(m, 3H), 3.87-3.75(m, 1H), 3.90-3.84(m, 1H), 5.24-5.11(m, 2H), 5.91-5.87(m, 1H), 6.95-6.91(m, 1H), 7.35-7.32(m, 1H), 7.67-7.65(m, 1H)。

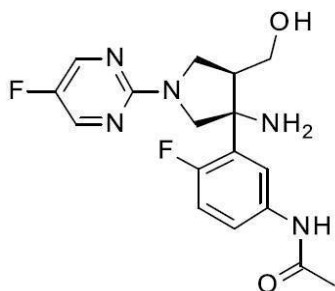
40

【0040】

50

製造 1 3

相対-N-[3-[(3S, 4R) -3-アミノ-1-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-3-イル]-4-フルオロフェニル]アセトアミド
【化 1 6】



10

相対-1-[3-[(3S, 4R) -3-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-3-イル]-4-フルオロフェニル]プロパン-2-オン、ジートルエンスルホン酸 (7.5 g、12.3 mmol) を、ACN (75 mL) に加える。2-クロロ-5-フルオロピリミジン (2.44 g、18.4 mmol) 及び DIPEA (7.5 mL、43 mmol) を加え、混合物を 20 時間、70 °C に加熱する。混合物を室温まで冷却し、濃縮する。水 (50 mL) を加え、混合物を 1 時間、スラリー形態として攪拌する。混合物をろ過し、真空下、室温で乾燥させ、シスラセミ混合物として表題化合物を得る (3.0 g)。残りの水溶液は、クロロホルム (3 × 20 mL) を用いて抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥し、乾固するまで濃縮し、真空内で乾燥させ、さらに表題化合物を得る (1.8 g)。総粗収率 (4.8 g、110%)。ES/MS (m/z) : 364 (M+H)。

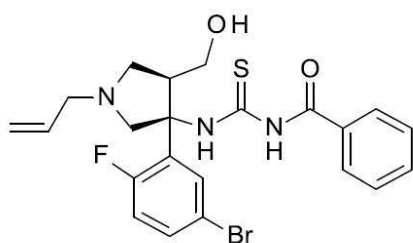
20

【0041】

製造 1 4

N-(((3S, 4R) -1-アリル-3-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-3-イル)カルバモチオイル)ベンズアミド
【化 1 7】

30



40

イソチオシアン酸ベンゾイル (15.0 g、91.9 mmol) を、((3R, 4S) -1-アリル-4-アミノ-4-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル)メタノール (30 g、91.1 mmol) の 0 °C の THF 溶液 (400 mL) に加える。溶液を 25 °C まで加温し、1 時間攪拌して、表題化合物の THF 溶液を得て、それをさらに精製することなく使用する。

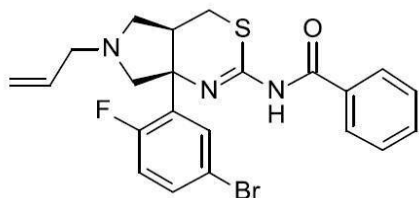
【0042】

製造 1 5

N-((4aR, 7aS) -6-アリル-7a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-2-イル)ベンズアミド、ジヒドロクロリド

50

【化 18】



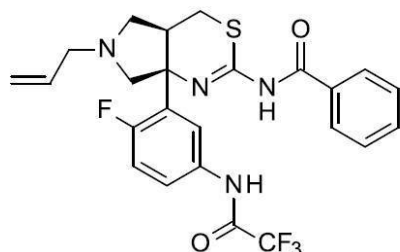
トリフェニルホスフィン (36.8 g、140.3 ミリモル) を、N-((3S, 4R)-1-アリル-3-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-3-イル)カルバモチオイル)ベンズアミド (91.1 ミリモル) の THF 溶液 (400 mL) に加える。アゾジカルボン酸ジ-tert-ブチル (31.6 g、137.2 ミリモル) の THF 溶液 (100 mL) を加える。混合物を 2 時間、20~30 °C で攪拌する。混合物を濃縮し、MTBE (400 mL) を加える。溶液を、珪藻土を通してろ過し、ケーキを MTBE (130 mL) で洗浄する。ろ液を 1 つにまとめ、1 N HCl の EtOAc 溶液 (200 mL) を加える。混合物を 2 時間攪拌し、次いで 500 mL に濃縮する。MTBE (320 mL) を加え、溶液をろ過し、ヘプタン (130 mL) で洗浄する。固形物を EtOAc (650 mL) 中でスラリー化させ、2 時間、50~60 °C で攪拌する。熱いスラリーをろ過し、固形物を EtOAc (130 mL) 及びヘプタン (130 mL) で洗浄する。固形物を EtOAc (650 mL) 中で再スラリー化させ、2 時間、50~60 °C で攪拌する。熱いスラリーをろ過し、EtOAc (130 mL) 及びヘプタン (130 mL) で洗浄する。固形物を乾燥させ、二 HCl 塩として表題化合物を得る (40 g、80%、99.5% ee)。第一の溶出異性体のキラル解析：カラム：IC Chiralpak、4.6 mm×250 mm×5 µm；溶離液：85% ヘキサン (0.1% ジエチルアミン)：15% イソプロピルアルコール (0.1% ジエチルアミン)；流速 1.0 mL/分、UV 282 nm によって、鏡像異性的に富化された (99.5% ee)、 $R_t = 12.5$ 分の鏡像異性体を確認する。

【0043】

製造 16

N-[(4aR, 7aS)-6-アリル-7a-[2-フルオロ-5-[(2, 2, 2-トリフルオロアセチル)アミノ]フェニル]-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル)ベンズアミド

【化 19】



15% 炭酸ナトリウム (440 mL) を、N-((4aR, 7aS)-6-アリル-7a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル)ベンズアミド、ジヒドロクロリド (495 g、717.88 ミリモル) の EtOAc (3 L) 及び水 (784 mL) の溶液に加える。混合物を 1~2 時間攪拌する。層を分離させ、有機層を、シリカゲル (40 g) を通してろ過し、EtOAc (600 mL) で洗浄する。ろ液を乾燥するまで濃縮し、N-((

(4 a R、7 a S) - 6 - アリル - 7 a - (5 - ブロモ - 2 - フルオロ - フェニル) - 4、4 a、5、7 - テトラヒドロピロロ [3、4 - d] [1、3] チアジン - 2 - イル) ベンズアミドを得る。トリフルオロアセトアミド (136.7 g、1.21 モル)、NaI (182.5 g、1.22 モル)、4 A 分子篩 (342 g)、及び K_2CO_3 (170.9 g、1.24 モル) を、N - ((4 a R、7 a S) - 6 - アリル - 7 a - (5 - ブロモ - 2 - フルオロ - フェニル) - 4、4 a、5、7 - テトラヒドロピロロ [3、4 - d] [1、3] チアジン - 2 - イル) ベンズアミド (341 g、494.54 ミリモル) の DMSO (525 mL) 及び 1、4 - ジオキサン (1.025 L) の溶液に加える。トランス - N、N' - ジメチルシクロヘキサン (81.6 g、573.66 ミリモル) 及びヨウ化銅 (27.3 g、143.34 ミリモル) の DMSO 溶液 (500 mL) をこの反応混合物に加える。この混合物を 5 分間攪拌する。この混合物を 100 °C まで加温し、8 時間攪拌し、24 °C まで冷却する。水 (5.9 L) 及び DCM (5.9 l) を加え、混合物をろ過し、層を分離させる。有機層を水 (5.9 L) で洗浄し、DCM 溶液で表題化合物を得て、それをさらなる精製を行うことなく使用する。

10

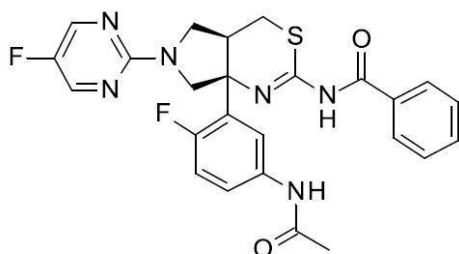
【0044】

製造 17

相対 - N - [(4 a R、7 a S) - 7 a - 5 - (アセトアミド) - 2 - フルオロ - フェニル) - 6 - (5 - フルオロピリミジン - 2 - イル) - 4、4 a、5、7 - テトラヒドロピロロ [3、4 - d] [1、3] チアジン - 2 - イル] ベンズアミド

【化 20】

20



THF (30 mL) を、相対 - N - [3 - [(3 S、4 R) - 3 - アミノ - 1 - (5 - フルオロピリミジン - 2 - イル) - 4 - (ヒドロキシメチル) ピロリジン - 3 - イル] - 4 - フルオロ - フェニル] アセトアミド (4.1 g、11.0 ミリモル) に加える。この混合物を水槽中で 0 °C まで冷却し、イソチオシアン酸ベンゾイル (1.50 mL、11.0 ミリモル) を加える。次いで、この混合物を 30 分以上室温に加温させる。1、1' - カルボニルジイミダゾール (1.9 g、11.0 ミリモル) を加え、混合物を 2 時間、室温で攪拌する。次いで、この混合物を 55 °C まで加熱し、さらに 18 時間攪拌する。水 (50 mL) を加え、混合物を EtOAc (50 mL) で抽出する。水層を、追加の EtOAc (25 mL) で抽出し、乾燥するまで濃縮する。粗残留物を、EtOAc 中、50 % DCM、次いで 100 % EtOAc で溶出するシリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製する。適切な分画を濃縮し、真空下で乾燥させ、シスラセミ混合物として表題化合物を得る (1.33 g、26 %)。ES/MS (m/z) : 509 (M+H)

30

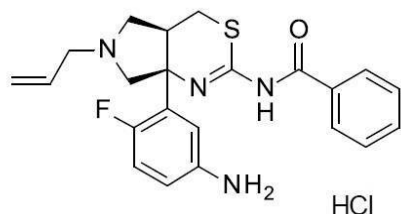
40

【0045】

製造 18

N - ((4 a R、7 a S) - 6 - アリル - 7 a - (5 - アミノ - 2 - フルオロ - フェニル) - 4、4 a、5、7 - テトラヒドロピロロ [3、4 - d] [1、3] チアジン - 2 - イル) ベンズアミド、塩酸塩

【化 2 1】



NaOH (28.7 g) 及び水 (2.7 L) を、N-[(4aR, 7aS)-6-アリル-7a-[2-フルオロ-5-[(2,2,2-トリフルオロアセチル)アミノ]フェニル]-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-2-イル]ベンズアミド (250 g、494.4 ミリモル) の DCM 溶液に加え、この混合物を 24℃ で 68 時間攪拌する。1 N HCl (3.5 L) を加え、pH を 1~3 とする。層を分離させ、水層を DCM (680 mL) で洗浄する。DCM (4 L) を水層に加え、次いで 21% 水酸化アンモニウムを加えて、pH を 8~10 とする。層を分離させ、有機抽出物を 1 つにまとめ、シリカゲル (170 g) を通してろ過し、DCM (1.4 L) で洗浄する。溶媒を乾燥するまで濃縮し、EtOAc (4 L) で希釈する。1 N HCl の EtOAc 溶液 (700 mL) を 25℃ 未満の温度で加え、この混合物を 1 時間攪拌する。この混合物を 7~8 体積まで濃縮し、EtOAc (2.8 L) を加える。得られた沈殿物をろ過し、EtOAc (400 mL) で洗浄する。固形物を乾燥させ、表題化合物を得る (246 g、52%)。

10

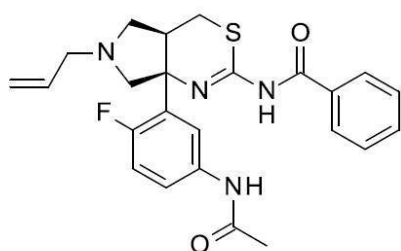
20

【0046】

製造 19

N-((4aR, 7aS)-7a-(5-アセトアミド-2-フルオロフェニル)-6-アリル-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-2-イル)ベンズアミド

【化 2 2】



30

無水酢酸 (23.5 g、0.23 モル) を、N-((4aR, 7aS)-6-アリル-7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-2-イル)ベンズアミド、塩酸塩 (100 g、0.153 モル) 及びトリエチルアミン (54.3 g、0.535 モル) の DCM 溶液 (800 mL) に加える。20~25℃ で 1 時間攪拌した後、飽和 NaHCO₃ (700 mL) 及び水 (600 mL) を加える。層を分離させ、表題化合物を得て、それを DCM 溶液としてさらなる精製を行うことなく使用する。

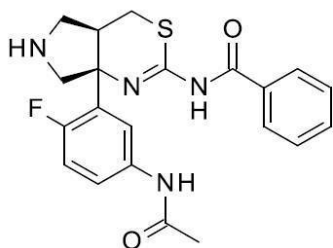
40

【0047】

製造 20

N-((4aR, 7aS)-7a-(5-アセトアミド-2-フルオロフェニル)-4,4a,5,7-テトラヒドロピロロ[3,4-d][1,3]チアジン-2-イル)ベンズアミド

【化 2 3】



10

トリフェニルホスフィン (4.0 g、0.015 mol) 及び 1、3-ジメチルバルビツール酸 (15.2 g、0.097 mol) を、N-((4aR, 7aS)-7a-(5-acetamidophenyl)-6-(5-fluoropyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-d][1,3]thiazine-2-yl)benzamide (0.153 mol) の DCM 溶液に加える。酢酸パラジウム (1.7 g、7.7 mmol) を加え、この混合物を 1 時間、20~30℃で攪拌する。25%水酸化アンモニウムを加え、層を分離させる。有機層を HOAc (500 mL の水中、3.0 当量) で洗浄し、25%水酸化アンモニウムを用いて pH を 8~9 に調節する。水層を DCM (2×500 mL) で抽出する。有機抽出物を 1 つにまとめ、3~4 体積に濃縮する。MTBE (1 L) を加え、この混合物をろ過する。この混合物を濃縮し、ヘプタン (1 L) を加える。得られた固形物をろ過し、回収し、乾燥させて表題化合物を得る (4.8 g、76%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 2.15 (s, 3H), 2.87-2.83 (m, 1H), 3.43-3.23 (m, 5H), 3.70-3.67 (m, 1H), 7.12-7.07 (m, 1H), 7.28-7.27 (m, 1H), 7.52-7.41 (m, 4H), 7.79 (m, 1H), 8.18-8.16 (m, 2H), ES/MS (m/z): 413.1 (M+H)。

20

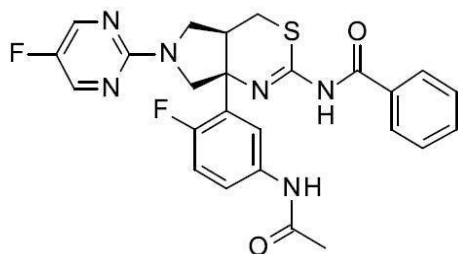
【0048】

製造 2 1

N-((4aR, 7aS)-7a-(5-acetamidophenyl)-6-(5-fluoropyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-d][1,3]thiazine-2-yl)benzamide

30

【化 2 4】



40

2-クロロ-5-フルオロピリミジン (28.9 g、218 mmol) 及び炭酸カリウム (33.46 g、242.1 mmol) を、N-((4aR, 7aS)-7a-(5-acetamidophenyl)-6-(5-fluoropyrimidin-2-yl)-4,4a,5,7-tetrahydro-1H-pyrido[3,4-d][1,3]thiazine-2-yl)benzamide (50 g、121.22 mmol) の DMF 溶液 (100 mL) に加える。この混合物を 8 時間、80~85℃に加熱する。この混合物を 24℃まで冷却し、ろ過し、DMF (100 mL) で洗浄する。固形物を水 (2 L) 中でスラリー化させ、ろ過し、表題化合物を得る (6.8.5 g、98%)。LC-MS: m/z = 509.2 (M+H)⁺, ¹H NMR (400 MHz, d₆-DMSO) δ ppm 1.22 (t, J = 7.28 Hz, 2 H) 1.92 - 2.07 (m, 6 H) 2.89 - 3.20 (m, 2 H) 3.36 - 3.44 (m, 1 H) 3.67 (t, J = 9.54 Hz, 1 H) 3.84 (br. s., 1 H) 4.16 (br. s., 2 H) 7.23 (br.

50

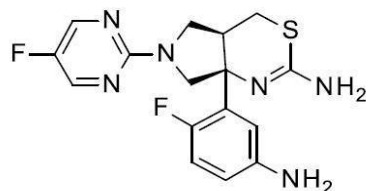
s., 2 H) 7.35 - 7.61 (m, 8 H) 7.77 (br. s., 2 H) 7.85 - 8.18 (m, 4 H) 8.48 (s, 4 H) 10.15 (br. s., 1 H) 10.46 - 10.59 (m, 1 H)。

【0049】

製造22

(4aR, 7aS) - 7a - (5-アミノ-2-フルオロフェニル) - 6 - (5-フルオロピリミジン-2-イル) - 4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-アミン

【化25】



10

水酸化リチウム (8.6 g、204.9ミリモル) を、N - ((4aR, 7aS) - 7a - (5-アセトアミド-2-フルオロフェニル) - 6 - (5-フルオロピリミジン-2-イル) - 4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル) ベンズアミド (80 g、157.3ミリモル) のメタノール溶液 (400 mL) に加える。この混合物を4時間、60~70℃に加熱する。濃HCl (132 g) を加え、この混合物を18時間、55℃で攪拌する。この混合物を30℃まで冷却し、濃縮してメタノールを除去する。水を加え、水層をDCM (3×) で抽出し、920 gの水溶液として表題化合物を得て、その総量の5.6%が表題化合物であり、それをさらなる精製を行うことなく使用する。

20

【0050】

別の製造22

硫酸 (33.4 mL、626.6ミリモル) を、(4aR, 7aS) - 7a - (2-フルオロフェニル) - 6 - (5-フルオロピリミジン-2-イル) - 4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-アミン (45.8 g、125.3ミリモル) のTFA溶液 (626 mL) に加える。この混合物を0℃に冷却し、20分間攪拌する。発煙硝酸 (6.2 mL、144.1ミリモル) を加え、反応混合物を22℃に加熱し、その温度で3時間攪拌する。反応混合物を蒸発させ、MTBEを加え (250 mL)、2回蒸発させる。残留物を真空下で恒量まで乾燥させ、次いで水 (147 mL) 及びエタノール (885 mL) に溶解させ、15分間、窒素を泡立てながら脱気する。溶液を耐圧反応容器に移し、10% Pd/Cペーストタイプ87L (6.6 g、6.27ミリモル) を加える。この混合物を追加のエタノール (700 mL) で希釈し、16時間、80 psiで水素を用いて加圧する。この反応混合物をろ過し、次いで10% Pd/Cペーストタイプ87L (6.6 g、6.27ミリモル) の第二の触媒充填を加え、混合物を80 psiまで加圧し、耐圧反応容器中で3日間攪拌する。反応混合物に窒素をパージし、珪藻土を通してろ過する。ろ液を蒸発させ、残留物を水 (200 mL) 及びEtOAc (200 mL) の間で分割させる。水層を分離させ、5℃まで冷却し、水酸化アンモニウム15% w/wで中和する。水層を、EtOAc (3×150 mL) で抽出する。有機層を1つにまとめ、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ過し、減圧下で蒸発させて、淡褐色の固形物として表題化合物を得る (47.7 g、残留EtOAc含有99%)。ES/MS (m/z) : 363 (M+H)。

30

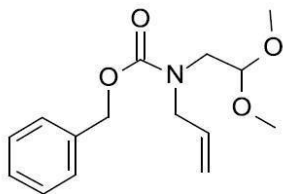
40

【0051】

製造23

N-アリル-N-(2,2-ジメトキシエチル)カルバミン酸ベンジル

【化 2 6】



N-(2,2-ジメトキシエチル)カルバミン酸ベンジル(50 g、208.9ミリモル)のトルエン溶液(180 mL)を、窒素雰囲気下で固形状水酸化カリウム(51.6 g、919.69ミリモル)を用いて処置する。10分後、塩化ベンジルトリエチルアンモニウム(0.8 g、3.1ミリモル)を加える。さらに10分後、臭化アリル(33 g、272.8ミリモル)のトルエン溶液(50 mL)を10分にわたり滴下して加える。得られた混合物を48時間、50℃で攪拌する。混合物を室温まで冷却し、水でクエンチする。有機層を分離させ、ブラインで洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、乾固するまで濃縮し、表題化合物を得る(44 g、75%)。ES/MS(m/z): 280(M+H)。

10

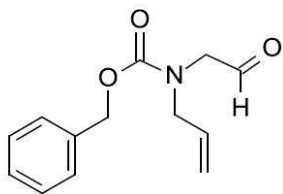
【0052】

製造 2 4

20

N-アリル-N-(2-オキソエチル)カルバミン酸ベンジル

【化 2 7】



30

N-アリル-N-(2,2-ジメトキシエチル)カルバミン酸ベンジル(30 g、107ミリモル)のギ酸(36.8 mL、860ミリモル)及び水(4.84 mL)の溶液を室温で一晩攪拌する。混合物を濃縮し、ヘキサン/EtOAc(1:2)及び水で希釈する。有機層を分離させ、pH=6までブライン溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥する。溶媒を蒸発させ、表題化合物を得る(25 g、99%)。ES/MS(m/z): 234(M+H)。

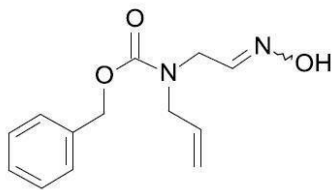
【0053】

製造 2 5

N-アリル-N-[2-ヒドロキシイミノエチル]カルバミン酸ベンジル

【化 2 8】

40



N-アリル-N-(2-オキソエチル)カルバミン酸ベンジル(25 g、107ミリモル)のACN溶液(150 mL)を、ヒドロキシルアミン塩酸塩(9.68 g、139ミ

50

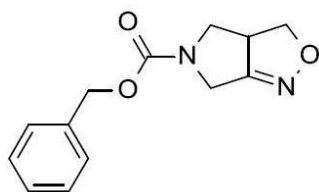
リモル)、及び酢酸ナトリウム三水和物(16 g、117.9ミリモル)の水溶液(75 mL)で処理する。混合物を室温で一晩攪拌する。ACNを蒸発させ、水溶液をEtOAcで抽出する。有機層を分離させ、硫酸マグネシウムで乾燥し、真空下で濃縮して表題化合物を得る(24 g、90%)。ES/MS(m/e): 249(M+H)。

【0054】

製造26

3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ[3, 4-c]イソキサゾール-5-カルボン酸ベンジル

【化29】



10

N-アリル-N-[2-ヒドロキシイミノエチル]カルバミン酸ベンジル(24 g、96.6ミリモル)のDCM溶液(338 mL)を、5%w/wの次亜塩素酸ナトリウム水溶液(106.08ミリモル、143.06 mL)を用いて10分にわたり、滴下して処理する。得られた混合物を室温で一晩攪拌する。40%重亜硫酸ナトリウム(7 g)の水溶液で反応をクエンチする。有機層を分離させ、硫酸マグネシウムで乾燥し、真空下で濃縮する。粗生成物を、ヘキサン中、5%EtOAcで溶出するシリカゲル上で精製し、表題化合物を得る(18 g、75%)。ES/MS(m/z): 247(M+H)。

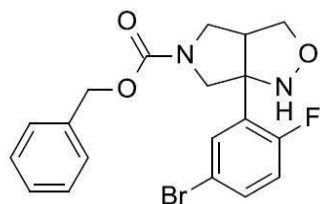
20

【0055】

製造27

6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロ-1H-ピロロ[3, 4-c]イソキサゾール-5-カルボン酸ベンジル

【化30】



30

n-ブチルリチウム(25.4 mL、40.6ミリモル)の1.6 Mヘキサン溶液を、-78℃の4-ブロモ-1-フルオロ-2-ヨードベンゼン(12.22 g、40.6ミリモル)のTHF溶液(60 mL)に滴下して加え、黄色溶液を得て、それを15分間、-78℃で攪拌する。三フッ化ホウ素エーテラート(5.14 mL、40.6ミリモル)を、別の-78℃の3, 3a, 4, 6-テトラヒドロピロロ[3, 4-c]イソキサゾール-5-カルボン酸ベンジル(5 g、20.3ミリモル)のTHF溶液(60 mL)に加え、この混合物を5分間、-78℃で攪拌する。この溶液を、前もって調製された-78℃の有機リチウム混合物にカニューレを介して加える。混合された混合物を30分間、-78℃で攪拌する。この混合物を、飽和塩化アンモニウム水溶液でクエンチし、室温に加熱する。この混合物をEtOAc(3×)で抽出し、有機抽出物を1つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、真空内で溶媒を除去する。粗生成物を、35分で、ヘキサン中、5%~100%EtOAcの勾配のシリカゲル上で精製し、表題化合物を得る(2.27 g、27%)。ES/MS(m/z): (⁷⁹Br/⁸¹Br) 421/423(M+

40

50

H)。

【0056】

製造28

1-(ベンゾイルカルバモチオイル)-6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-3,3a,4,6-テトラヒドロピロロ[3,4-c]イソキサゾール-5-カルボン酸ベンジル

【化31】



10

イソチオシアン酸ベンゾイル(2.87mL、21.28ミリモル)を、6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-3,3a,4,6-テトラヒドロ-1H-ピロロ[3,4-c]イソキサゾール-5-カルボン酸ベンジル(5.977g、14.2ミリモル)のTHF溶液(95mL)に滴下して加え、窒素雰囲気下で一晩攪拌する。溶媒を真空内で除去する。粗生成物を、30分で、ヘキサン中、5%~100%EtOAc勾配のシリカゲル上で精製し、表題化合物を得る(6.05g、73%)。ES/MS(m/z) : (⁷⁹Br/⁸¹Br) 584/586 (M+H)。

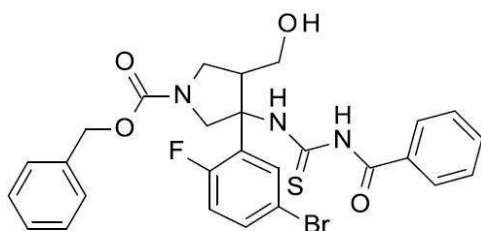
20

【0057】

製造29

3-(ベンゾイルカルバモチオイルアミノ)-3-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-1-カルボン酸ベンジル

【化32】



30

1-(ベンゾイルカルバモチオイル)-6a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-3,3a,4,6-テトラヒドロピロロ[3,4-c]イソキサゾール-5-カルボン酸ベンジル(6.05g、10.4ミリモル)と亜鉛(亜鉛末、<10ミクロン)(6.77g、103.5ミリモル)の混合物を、窒素雰囲気下、一晩、室温で、HOAc(52mL)中で攪拌する。反応物をEtOAcで希釈し、珪藻土を通してろ過する。溶媒を真空内で除去し、残留物をEtOAc、水及び飽和重炭酸ナトリウム水溶液で希釈する。この混合物をEtOAc(3×)で抽出し、混合有機層を1つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、溶媒を真空内で除去する。粗生成物を、30分で、ヘキサン中、5%~100%EtOAc勾配のシリカゲル上で精製し、表題化合物を得る(5.222g、86%)。ES/MS(m/z) : (⁷⁹Br/⁸¹Br) 586/588 (M+H)。

40

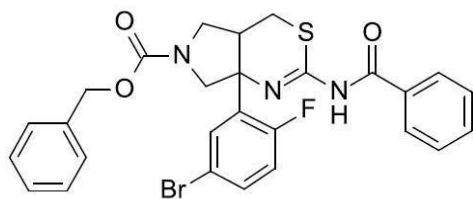
【0058】

製造30

2-ベンズアミド-7a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4,4a,5,

50

7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-6-カルボン酸ベンジル
【化33】



10

1, 1'-カルボニルジイミダゾール (2.87 g、17.7ミリモル) を、3-(ベンゾイルカルバモチオイルアミノ)-3-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-1-カルボン酸ベンジル (5.198 g、8.86ミリモル) の THF 溶液 (52 mL) に加える。この混合物を室温で 1.5 時間攪拌し、次いで反応物を一晩、窒素雰囲気下で加熱還流する。反応物を冷却し、水で希釈し、EtOAc (3×) で抽出する。有機層を 1 つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、溶媒を真空で除去する。粗生成物を、30 分で、ヘキサン中、5%~100% EtOAc 勾配のシリカゲル上で精製し、表題化合物を得る (2.93 g、58%)。ES/MS (m/z) : (⁷⁹Br / ⁸¹Br) . 568 / 570 (M+H)。

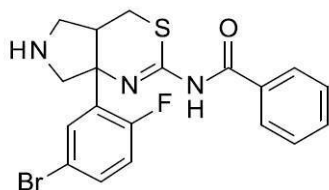
20

【0059】

製造 31

N-[7a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4a, 5, 6, 7-テトラヒドロ-4H-ピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル]ベンズアミド

【化34】



30

ヨードトリメチルシラン (2.21 mL、15.46ミリモル) を、室温の 2-ベンズアミド-7a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-6-カルボン酸ベンジル 2.93 g、5.15ミリモル) の ACN 溶液 (44 mL) に滴下して加える。反応物を 2 時間、室温で攪拌し、溶媒を真空で除去する。粗生成物を、3:1 の DCM:メタノール、次いでメタノール中、2:1 の DCM:7N アンモニアを用いた SCX カラムで精製し、表題化合物を得る (2.098 g、94%)。ES/MS (m/z) : (⁷⁹Br / ⁸¹Br) 434 / 436 (M+H)。

40

【0060】

製造 32

2-ベンズアミド-7a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-6-カルボン酸 tert-ブチル

【化 3 5】



ジー t ーブチルジカルボン酸（1.16 g、5.31ミリモル）及びトリエチルアミン（1.01 mL、7.25ミリモル）を、N-[7a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4a, 5, 6, 7-テトラヒドロ-4H-ピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル]ベンズアミド（2.098 g、4.83ミリモル）のDCM溶液（48 mL）に加える。反応物を窒素雰囲気下で1時間、室温で攪拌する。溶媒を真空で除去し、粗生成物を、30分で、ヘキサン中、5%~100% EtOAc 勾配のシリカゲル上で精製し、表題化合物を得る（2.556 g、99%）。ES/MS (m/z) : (⁷⁹Br/⁸¹Br) 534/536 (M+H)。

10

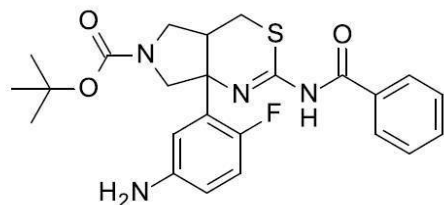
【0061】

製造 3 3

7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-2-ベンズアミド-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-6-カルボン酸 tert-ブチル

20

【化 3 6】



30

2-ベンズアミド-7a-(5-ブロモ-2-フルオロフェニル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-6-カルボン酸 tert-ブチル（2.556 g、4.8ミリモル）とトランス-N, N'-ジメチル-1, 2-シクロヘキサジアミン（150 mg、1.1ミリモル）のエタノール溶液（50 mL）を、アジ化ナトリウム（933 mg、14.3ミリモル）で処理する。L-アスコルビン酸ナトリウム塩（0.66 M、3.2 mL、2.1ミリモル）及び水（1 mL）の水溶液を加え、フラスコの上部を窒素でパージする。この混合物を硫酸銅（II）五水和物（0.33 M、3.2 mL、1.1ミリモル）の水溶液で処理し、この混合物を、前もって80℃に加熱されたホットプレート上で直ちに1.5時間、窒素雰囲気下で加熱する。均一な混合物は加熱を行うことで得られる。反応物を冷却し、氷水で希釈し、混合物をEtOAc（3×）で抽出する。有機抽出物を1つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、溶媒を真空で除去して粗アジ化生成物を得る。この粗アジ化生成物を、冷エタノール（150 mL）中、10%パラジウム炭素と混合させ、真空/窒素、次いで真空/水素を用いて混合物をパージする。この混合物を5時間、30 psiの水素下、室温で攪拌する。反応物をベントし、珪藻土を通してろ過し、ろ過ケーキをDCMでリンスする。真空内でろ液から溶媒を除去し、粗生成物を、DCM中、50% EtOAcのシリカゲル上で精製し、表題化合物を得る（2.014 g、89%）。ES/MS (m/z) : 471 (M+H)。

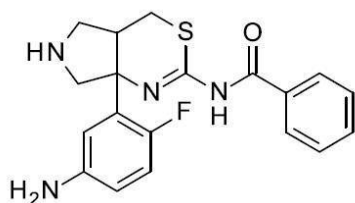
40

【0062】

製造 3 4

50

N-〔7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-4a, 5, 6, 7-テトラヒドロ-4H-ピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-2-イル〕ベンズアミド
【化37】



10

TFA (10 mL) を、7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-2-ベンズアミド-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-6-カルボン酸 tert-ブチル (2.013 g、4.28 ミリモル) の DCM 溶液 (30 mL) に加え、混合物を 4 時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌する。溶媒を真空内で除去し、粗生成物を、3:1 の DCM:メタノール、次いでメタノール中、2:1 の DCM:7N アンモニアを用いた SCX カラムで精製し、表題化合物を得る (1.555 g、98%)。ES/MS (m/z): 371 (M+H)。

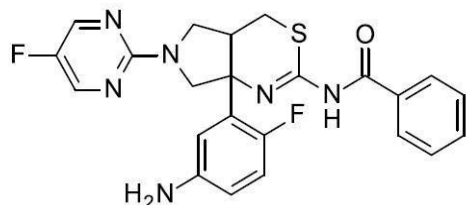
【0063】

製造35

ラセミ体 N-〔7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-2-イル〕ベンズアミド

20

【化38】



30

N-〔7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-4a, 5, 6, 7-テトラヒドロ-4H-ピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-2-イル〕ベンズアミド (705 mg、1.90 ミリモル)、5-フルオロ-2-クロロピリミジン (1.01 g、7.61 ミリモル)、及び DIPEA (1.66 mL、9.52 ミリモル) の溶液を、1, 4-ジオキサン (20 mL) 中で 4 時間、窒素雰囲気下で加熱還流する。反応物を冷却し、水で希釈し、EtOAc (3×) で抽出する。有機層を 1 つにまとめ、硫酸ナトリウム上で乾燥させ、ろ過し、真空で溶媒を除去し、粗生成物を得る。この粗生成物を、25 分で、ヘキサン中、5%~100% EtOAc 勾配のシリカゲル上で精製し、表題化合物を得る (590 mg、66%)。ES/MS (m/z): 467 (M+H)。

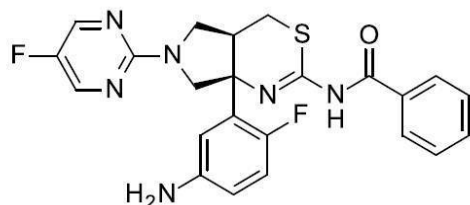
40

【0064】

製造36

N-〔(4aR, 7aS)-7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ〔3, 4-d〕〔1, 3〕チアジン-2-イル〕ベンズアミド、(異性体1)

【化 3 9】



ラセミ体 N- [7a- (5-アミノ-2-フルオロフェニル) -6- (5-フルオロピリミジン-2-イル) -4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-2-イル] ベンズアミド (1.694 g、3.63 ミリモル) を、キラル HPLC (カラム: Chiralcel OJ、8 x 35 cm; 溶離液: 90% メタノール (0.2% ジメチルエチルアミン) 及び 10% ACN; 流速 400 mL/分、UV 280 nm) により精製する。最初に溶出された異性体の解析 (カラム: Chiralcel OJ-H 0.46 x 15 cm; 溶離液: 10:90 の ACN: メタノール (0.2% ジメチルエチルアミン含有); 流速: 0.6 mL/分、UV 280 nm) により、鏡像異性的に富化された (99% ee)、 $R_t = 6.70$ 分の鏡像異性体を確認する (723 mg、43%)。ES/MS (m/z): 467 (M+H)。

10

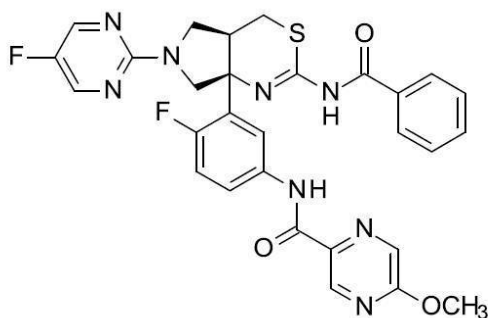
【0065】

20

製造 37

N- [3- [(4aR, 7aS) -2-ベンズアミド-6- (5-フルオロピリミジン-2-イル) -4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7a-イル] -4-フルオロフェニル] -5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド、異性体 1

【化 40】



30

N- [(4aR, 7aS) -7a- (5-アミノ-2-フルオロフェニル) -6- (5-フルオロピリミジン-2-イル) -4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-2-イル] ベンズアミド、(異性体 1) (0.361 g、0.77 ミリモル) を、DCM (4 mL) と DMF (0.5 mL) の混合液中に溶解させる。5-メトキシピラジン-2-カルボン酸 (240 mg、1.55 ミリモル)、HOBT (210 mg、1.55 ミリモル) 及び EDCI (300 mg、1.55 ミリモル) をこの混合液に加え、この混合液を室温で一晩攪拌する。反応溶液を 12 g のシリカゲルローディングカラム上に直接加え、40 g のシリカゲルカラムを用いて、0~100% EtOAc/ヘキサン勾配で溶出して精製する。生成物を EtOAc (200 mL) 中に溶解させ、1N NaOH (2 x 50 mL) とブライン (1 x 50 mL) で洗浄する。シリカゲル精製を上述のように繰り返し、表題化合物を得る (350 mg、74%)。ES/MS (m/z): 603 (M+H)。

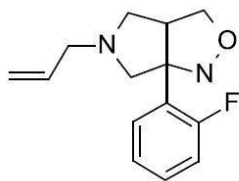
40

【0066】

製造 38

50

5-アリル-6a-(2-フルオロフェニル)-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロ-1H-ピロロ[3, 4-c]イソキサゾール
【化41】



10

フローケミストリー反応工程：343mlのシームレスなステンレススチールの管型反応装置(OD=1/8インチ)をGCオープン内に配置し、20分間、20mL/分で、トルエンでフラッシュする。窒素背圧(720psig)を印加し、GCの温度を210℃に設定する。温度が210℃に達した後、2-(ジアリルアミノ)-1-(2-フルオロフェニル)エタノンオキシム(480.51g、1.74mol)のトルエン溶液(5.81L)を、連続モードで作動する高圧シリンジポンプのペアを用いて、22.866mL/分で、反応装置にポンプで送り出し、15分の滞留時間を得る。すべての原液が消費された後、反応装置を30分間、22.866mL/分でトルエンを用いてフラッシュする。GCオープンの温度を25℃に設定し、完了溶液を集め、真空下で濃縮する。溶媒を蒸発させ、残留物をDCM(2.5L)及び水(5L)に溶解させる。HClを用いてpHを1に調節し、水層を分離させ、NaOHを用いて中和し、pHを10に調節する。水層を、MTBE(3×2.5L)を用いて抽出する。有機抽出物を1つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、乾固するまで蒸発させ、粗表題化合物を得て(248g、47%)、それをさらなる精製を行うことなく使用する。ES/MS(m/z): 249(M+H)。

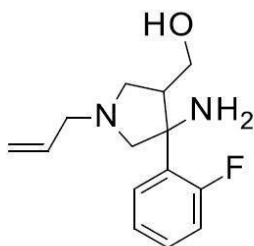
20

【0067】

製造39

1-アリル-4-アミノ-4-(2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メタノール

【化42】



30

亜鉛末(590g、9mol)を、5-アリル-6a-(2-フルオロフェニル)-3, 3a, 4, 6-テトラヒドロ-1H-ピロロ[3, 4-c]イソキサゾール(3559g、1.29mol)の、メタノール(2.85L)と飽和塩化アンモニウム水溶液(3.56L)の混合溶液に添加し、この混合溶液を16時間、70℃で加熱する。反応溶液を60℃に冷却し、THF(2.85L)で希釈し、熱いうちに珪藻土を通してろ過する。ろ液を蒸発して有機溶媒を取り除き、水性混合物をクエン酸10%w/w水溶液(4L)とEtOAc(3.5L)で希釈する。有機層を分離させ、水層をEtOAc(2×2L)で洗浄する。水層をNaOH 50%w/wtで中和し、pHを10に調節して、次いでEtOAc(2×1.5L)で抽出する。有機抽出物を1つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、乾燥するまで蒸発させ、粗表題化合物を得る(299g、92%)。ES/MS(m/z): 251(M+H)。

40

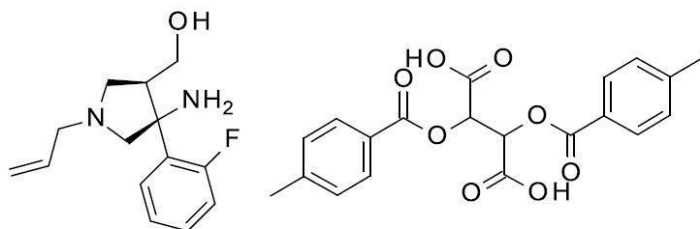
50

【0068】

製造40

[(3R, 4S) - 1-アリル-4-アミノ-4-(2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メタノール; 2, 3-ビス[(4-メチルベンゾイル)オキシ]ブタン二酸

【化43】



10

ジ-*p*-トルオイル-L-酒石酸(348.6g、884ミリモル)の1-メトキシ-2-プロパノール溶液(1.13L)を、前もって40℃に加熱されていた[(3R, 4S) - 1-アリル-4-アミノ-4-(2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メタノール(225.9g、902ミリモル)の1-メトキシ-2-プロパノール溶液(1.13L)に加える。反応物を22℃に冷却し、18時間攪拌する。白色固形物をろ過により集め、1-メトキシ-2-プロパノール(600ml)で洗浄する。集めた固形物を乾燥させ、表題化合物を得る(183.01g、31.8%)。ES/MS(m/z): 251(M+H)。

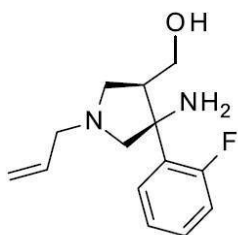
20

【0069】

製造41

[(3R, 4S) - 1-アリル-4-アミノ-4-(2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メタノール

【化44】



30

[(3R, 4S) - 1-アリル-4-アミノ-4-(2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メタノール; 2, 3-ビス[(4-メチルベンゾイル)オキシ]ブタン二酸(211g、331ミリモル)を水(2.1L)とEtOAc(2.3L)に溶解させる。HCl 35%w/wを加え、pHを1に調節する。水層を分離させ、NaOH 50%w/wを用いてpHを10に調節し、EtOAc(2×)を用いて抽出する。水層のpHを、NaOH水溶液を用いて10に調節し、水溶液のpHもpH=10に維持しながらMTBE(3×)を用いて抽出する。有機抽出物を1つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、乾燥するまで濃縮し、粗表題化合物を得る(73g、88%、94.8% ee)。この生成物をキラルクロマトグラフィー: カラムAS-H、溶離液10%イソプロピルアルコール、2%イソプロピルアミン; 流速3mL/分、UV220; 圧力は100バール、35℃、により解析し、2番目に溶出する異性体として表題化合物を得る。R_f = 2.26分。ES/MS(m/z): 251(M+H)。

40

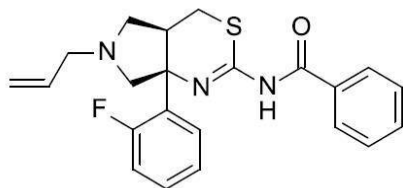
【0070】

50

製造 4 2

N-[(4aR, 7aS)-6-アリル-7a-(2-フルオロフェニル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル]ベンズアミド

【化 4 5】



10

[(3R, 4S)-1-アリル-4-アミノ-4-(2-フルオロフェニル)ピロリジン-3-イル]メタノール(129.7g、414ミリモル)のTHF溶液(2、3L)を窒素雰囲気下で0℃に冷却する。イソチオシアン酸ベンゾイル(61.5mL、456ミリモル)を、5℃未満の温度を維持しながら加える。反応物を3時間にわたり室温に加熱し、1、1'-カルボニルジイミダゾール(87.4g、538.9ミリモル)を加え、反応物を1時間、22℃で攪拌し、次いで16時間、70℃に加熱する。反応混合物を22℃に冷却し、溶媒を蒸発させる。残留物を、EtOAc(1L)及び水(1L)で分割させる。有機層を分離させ、水層をEtOAc(2×400mL)で抽出する。有機層を1つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、乾固するまで蒸発させ、粗表題化合物を得る。粗生成物を、0~40%のDCMのEtOAc/DCM勾配で溶出するシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、残留溶媒を含有する淡黄色の固形物として表題化合物を得る(170g、99%)。ES/MS(m/z): 396(M+H)。

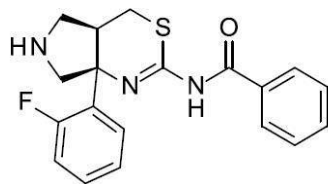
20

【0071】

製造 4 3

N-[(4aR, 7aS)-7a-(2-フルオロフェニル)-4a, 5, 6, 7-テトラヒドロ-4H-ピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル]ベンズアミド

【化 4 6】



30

2-メルカプト安息香酸(122g、793ミリモル)、ビス(ジベンジリデンアセトン)パラジウム(4.15g、7.21ミリモル)、及び1、4-ビス(ジフェニルホスフィノ)ブタン(3.14g、7.21ミリモル)を、窒素雰囲気下でN-[(4aR, 7aS)-6-アリル-7a-(2-フルオロフェニル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル]ベンズアミド(178.21g、360ミリモル)の無水2-メチルテトラヒドロフラン(1.96L)溶液に加える。この溶液を、真空/窒素サイクルを3回行うことにより脱気し、次いで、この反応物に15分間、窒素を泡立たせる。この反応物に窒素を泡立たせながら、反応混合物を40℃に加熱する。反応物が40℃に達した時点で、泡立てることを止め、反応混合物を窒素雰囲気下で3時間、40℃で攪拌する。反応物を22℃に冷却し、水(2L)で希釈する。HCl(5M)溶液を加えてpHを1に調節する。水層を分離させ、追加のEtOAc(2×800mL)で洗浄する。水層のpHを、NaOH50%w/wを用いて10に調

40

50

節し、次いでEtOAc（10L）を用いて抽出する。水層を追加のEtOAc（2×750mL）で洗浄する。有機抽出物を1つにまとめ、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、乾固するまで蒸発させ、淡黄色の固形物として粗表題化合物を得る（124.7g、97%）。ES/MS（m/z）：356（M+H）。

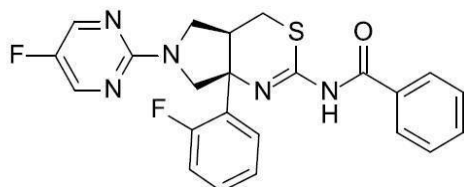
【0072】

製造44

N-[(4aR, 7aS)-7a-(2-フルオロフェニル)-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル]ベンズアミド

【化47】

10



N-[(4aR, 7aS)-7a-(2-フルオロフェニル)-4a, 5, 6, 7-テトラヒドロ-4H-ピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル]ベンズアミド（124.7g、256ミリモル）、DIPEA（67mL）、5-フルオロ-2-クロロピリミジン（29.3mL、307ミリモル）のN-メチルピロリドン溶液（997mL）を16時間、100℃に加熱する。反応物を22℃に冷却し、15℃未満の温度を維持しながら、10℃に冷却された水（10L）へと注ぐ。淡いクリーム状の固形物をろ過により集め、追加の水で洗浄する。湿った固形物をEtOAc（2L）に溶解させ、分離漏斗に移す。塩化ナトリウム水溶液5%w/w（1L）を加え、有機層を分離させ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、ろ液を減圧下で蒸発させる。生成物を、0～40%EtOAc/イソヘキサンの勾配を用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、淡黄色の固形物として表題化合物を得る（116g、70%）。ES/MS（m/z）：452（M+H）。

20

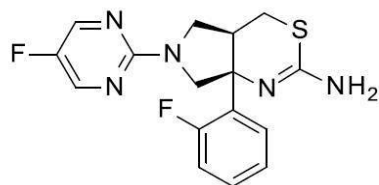
【0073】

30

製造45

(4aR, 7aS)-7a-(2-フルオロフェニル)-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-アミン

【化48】



40

水酸化リチウム（9.26g、386ミリモル）を、N-[(4aR, 7aS)-7a-(2-フルオロフェニル)-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-イル]ベンズアミド（158.6g、351.6ミリモル）のメタノール混合物（1.6L）に加える。この混合物を4時間、70℃に加熱し、次いで22℃に冷却する。反応混合物を真空下で黄色残留物になるまで蒸発させる。この残留物を水（1L）及びEtOAc（750mL）で分割させる。HCl（5M水溶液）を加え、pHを1に調節する。水層を分離させ、有機層をEtOAc（2×200mL）で洗浄する。水層のpHをNaOH50%w/w水

50

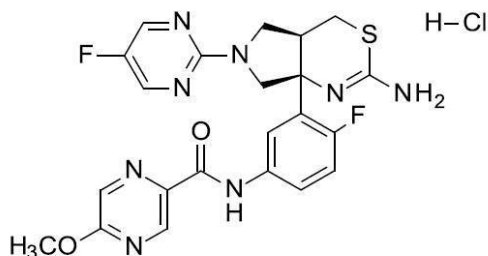
溶液を用いて、 $\text{pH} = 10$ に調節し、 EtOAc ($3 \times 1 \text{ L}$)を用いて抽出する。有機抽出物を1つにまとめ、硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過し、減圧下で蒸発させ、淡黄色固形物として粗表題化合物を得る (133.3 g 、 99% 、 12% の残留 EtOAc を含有)。ES/MS (m/z): 348 ($M+H$)。

【0074】

製造46

N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド塩酸塩

【化49】



N-[3-[(4aR, 7aS)-2-ベンズアミド-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド、異性体1 (0.350 g 、 0.58 ミリモル)をTHF (2 mL)に溶解させ、次いでメタノール (4 mL) 及びエタノール (4 mL)を加える。O-メチルヒドロキシルアミン塩酸塩 (495 mg 、 5.81 ミリモル) 及びピリジン ($470 \mu\text{L}$ 、 5.81 ミリモル)をこの混合物に加え、反応物を 50°C に加温し、一晚攪拌する。シリカゲル (約 10 g)を反応物に加え、混合物を濃縮する。シリカゲル上で乾燥されたサンプルを空のカートリッジにロードし、DCM中、 7 N アンモニアメタノールの $0 \sim 10\%$ 勾配で溶出して精製する。生成物は、 $3:1$ のDCM:メタノール、次いでメタノール中、 $2:1$ のDCM: 7 N アンモニアを用いたSCXカラムで二度目の精製を行う。生成物に、DCM中、 7 N アンモニアメタノールの $0\% \sim 10\%$ 勾配を用いたシリカゲル上で最終的な精製を行い、表題化合物の遊離塩基を得る。この物質をDCM (5 mL)に溶解させ、 1 M HClのジエチルエーテル溶液 (0.20 mL 、 $660 \mu\text{mol}$)を加える。溶媒を真空内で除去して表題化合物を得る (71 mg 、 23%)。ES/MS (m/z): 498 ($M+H$)。

【0075】

粉末X線回析 (XRD)

結晶質固形物のXRDパターンは、 35 kV 及び 50 mA で作動する、Cu K α 線 $\lambda = 1.54060 \text{ \AA}$ を備えたBruker D4 Endeavor粉末X線回析装置及びVantec検出器で得る。サンプルは、工程サイズが 2θ の 0.009° 、及びスキャン速度が 0.5 秒/工程で、 2θ で $4 \sim 40^\circ$ の間で、ならびに 0.6 mm の発散 (divergence)、 5.28 の固定アンチスキャッター (anti-scatter)、及び 9.5 mm の検出スリットで、スキャンされる。乾燥粉末は石英の試料容器上にパックされ、ガラススライドを用いて滑面を得る。結晶形の回析パターンはを周囲温度及び相対湿度で集める。結晶学の分野において、任意の所与の結晶形に関し、回析ピークの相対強度は、たとえば結晶形態及び傾向などの因子に起因する優先される方向性によって変化しうることが周知である。優先される方向性の効果が存在する場合、ピーク強度は変化するが、多形体の特徴的なピーク位置は変化しない。たとえば、The United States Pharmacopeia #23, National Formulary #18, pages 1843-1844, 1995を参照のこと。さらに

10

20

30

40

50

、結晶学分野において、任意の所与の結晶形に関し、角度のピーク位置は若干変化し得ることも周知である。たとえば、ピーク位置は、試料が分析される温度もしくは湿度の変動、試料の移動、または内部標準の有無によって変わり得る。本件の場合、 2θ で ± 0.2 のピーク位置の変動性は、指定された結晶形の明確な特定を阻害することなく、これらの潜在的な変化を考慮している。結晶形の確認は、特徴的なピーク($^\circ 2\theta$ の単位)、典型的にはより突出したピークの任意の固有の組み合わせに基づき行われ得る。大気温度及び相対湿度で集められた結晶形回析パターンは、 8.853 及び 26.774 度 2 シートでのNIST 675標準ピークに基づき調節される。

【0076】

製造47

結晶形2 N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド(水和物)

塩化オキサリル($888\mu\text{L}$ 、 10.2 ミリモル)を、5-メトキシピラジン-2-カルボン酸(1.6g 、 10.2 ミリモル)のACN(53mL)及びDMF($848\mu\text{L}$)の溶液に加える。 15 分後、新たに調製した溶液を、前もって 50°C に加熱された(4aR, 7aS)-7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-アミン(2.65g 、 7.3 ミリモル)の水(53mL)及びエタノール(53mL)の混合溶液に加える。反応混合物を 1 時間、 50°C で攪拌し、 22°C に冷却し、次いでこの温度で一晩攪拌する。有機溶媒を真空下で蒸発させ、水性混合物をNaOH 50% w/w水溶液で処理し、 $\text{pH}=10$ に調節する。淡いクリーム状の固形物を単離させ、追加の水で洗浄する。固形物をイソプロピルアルコール($2\times$)で希釈し、溶媒を蒸発させる。粗物質を、アンモニア処理メタノール(2N)/DCMの勾配を用いたシリカゲルクロマトグラフィーにより精製する。所望の生成物を含有する分画を1つにまとめ、溶媒を蒸発させて、オフホワイトの固形物として表題化合物を得る(1.9g 、 52%)。ES/MS(m/z): 499 (M+H)。

【0077】

結晶形2 N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド(水和物)の別の調製法

ACN(500mL)をDMF(19.2mL 、 248.9 ミリモル)に加える。塩化オキサリル(39.3g 、 309.63 ミリモル)、次いで5-メトキシピラジン-2-カルボン酸(46.0g 、 298.4 ミリモル)をこのDMF/ACN溶液に加える。別のフラスコで、(4aR, 7aS)-7a-(5-アミノ-2-フルオロフェニル)-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-2-アミン(56.8g 、 156.75 ミリモル)の水溶液をACN(500mL)に加え、水酸化アンモニウム(95mL)を用いて pH を9に調節する。この混合物を、次いで、 $50\sim 55^\circ\text{C}$ に加熱する。塩化オキサリル溶液を滴下して加え、混合物を 3 時間攪拌する。水酸化アンモニウムを用いて pH を8~9に調節する。得られた沈殿物をろ過し、水で洗浄し、乾燥させて表題化合物を得る(123g)。固形物をアセトン(250mL)中で 1.5 時間スラリー化させ、ろ過する。湿性ケーキをアセトンで洗浄し、表題化合物を得る(110g 、HPLCによる純度は 90.5%)。THF(1L)及び活性炭(9g)をこの固形物に加え、混合物を一晩加熱還流する。混合物を、珪藻土を通してろ過し、THF(150mL)で洗浄する。有機溶液を 10 体積まで濃縮し、 60°C に加熱する。水(430mL)を加え、混合物を 8 時間、 60°C で攪拌する。混合物を室温まで冷却し、 10 時間攪拌する。得られた固形物をろ過し、THF/水(7:6)で洗浄し、乾燥させて表題化合物を得る(69g 、 88%)LC-

MS : (m/z) 499 (M+H)、純度 : 98.3%。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ ppm 2.99 - 3.07 (m, 2 H) 3.07 - 3.14 (m, 1 H) 3.58 - 3.67 (m, 1 H) 3.68 - 3.76 (m, 1 H) 3.76 - 3.84 (m, 1 H) 4.02 (s, 3 H) 4.07 (d, J=10.92 Hz, 1 H) 6.08 (s, 2 H) 7.19 (dd, J=11.98, 8.72 Hz, 1 H) 7.78 - 7.89 (m, 2 H) 8.41 (s, 1 H) 8.44 (s, 2 H) 8.88 (s, 1 H) 10.60 (s, 1 H)。

【0078】

結晶形2 N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド (水和物) の一般的な製造手順

N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドを、約71 mg/mL 溶媒の濃度、約23℃で、THF中でスラリー化させる。約60℃～約63℃で発生する溶解まで、このスラリーを攪拌しながら加熱する。約95:5のTHF:水の溶媒比率を得るよう、この熱い溶液に水を加える。N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの結晶形2の種晶を加える(約3重量%の投入量)。得られた薄いスラリーを、約20分間、約60℃～約63℃に維持し、次いで約2～約4時間にわたり、約5.3～約5.5体積の水を加え、約69:31のTHF:水の溶媒比率とする。次いでこのスラリーを約30分間、約60℃～約63℃に維持し、その後、約1時間にわたり約23℃に冷却し、次いで、約8～12時間、攪拌する。次いでこのスラリーをろ過し、THF:水(35:65)を用いて軽くリンスし、低真空下、約40℃で約8～12時間乾燥させ、水和された所望の結晶形2のN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドを得る。

【0079】

結晶形2のN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの調製試料は、以下の表1に記載されるように、回析ピーク(2シータ値)を有するとして、Cu Kα線を用いたXRDパターンにより特徴解析される。具体的には、このパターンは、0.2度の回析角に対する許容誤差で、18.6°、19.3°、及び26.7°からなる群から選択されるピークのうち1つ以上と組み合わせて、11.8°でピークを有する。

表1: 結晶形2の粉末X線回析ピーク

【表 1】

ピーク	角度 (2θ) +/-0.2°	相対強度 (最も高いピーク強度の%)
1	11.8	100.0
2	18.6	71.4
3	19.3	45.5
4	26.7	41.9
5	20.6	27.3
6	9.0	19.0
7	24.8	18.5
8	22.4	15.5
9	31.9	14.3
10	10.6	11.2

10

【0080】

結晶形 2 の N- [3- [(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドは、室温及び約 15% 超の相対湿度で安定な結晶形である。

20

【0081】

製造 48

結晶形 3 の N- [3- [(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド

N- [3- [(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドを熱重量分析のパンにロードし、約 170℃ に加熱して、約 5 分間、170℃ で維持する。この混合物を室温に冷却し、表題化合物を得る。

30

【0082】

結晶形 3 の N- [3- [(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの別の製造。

N- [3- [(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド (121mg) と ACN (5mL) をバイアル中で混合し、90℃ の攪拌プレート上で加熱する。約 30 分後、固形物のほとんどが溶解し、濁った溶液を得る。結晶形 3 の種晶を加え、試料を約 90℃ で約 1 時間、攪拌する。加熱器を取り除き、混合物を攪拌して、明白色の固形物を得る。固形物を真空ろ過により単離し、約 10 分間、エアースチーム下で乾燥させ、次いで約 8~12 時間、約 80℃、低真空下で乾燥させ、表題化合物を得る。

40

【0083】

結晶形 3 の N- [3- [(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カル

50

ボキサミドの製造試料は、以下の表 2 に記載されるように、回析ピーク（2 シータ値）を有するとして、Cu K α 線を用いた X R D パターンにより特徴解析される。具体的には、当該パターンは、0. 2 度の回析角に対する許容誤差で、1 8. 1 °、2 7. 0 °、及び 1 9. 7 ° からなる群から選択されるピークのうち 1 つ以上と組み合わせで、1 5. 7 ° でピークを有する。

表 2：結晶形 3 の粉末 X 線回析ピーク

【表 2】

ピーク	角度 (2-シータ°) +/-0. 2°	相対強度 (最も高いピーク強度の%)
1	15.7	100.0
2	18.1	98.5
3	27.0	80.2
4	19.7	75.4
5	25.3	75.2
6	18.7	50.0
7	17.3	49.7
8	5.2	44.0
9	10.4	41.7
10	11.9	37.7

10

20

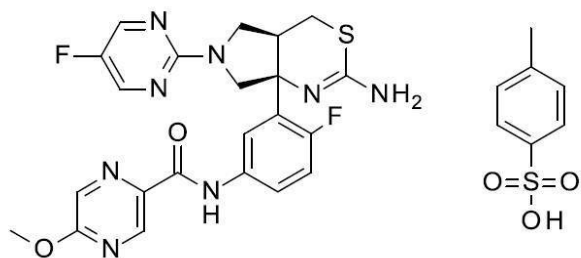
【0084】

実施例 1

N- [3- [(4 a R, 7 a S)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4 a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7 a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド：トルエンスルホン酸

【化 50】

30



水和された結晶形 2 の N- [3- [(4 a R, 7 a S)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4 a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7 a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド (1 4 9. 1 5 m g) を酢酸エチル (2 m L) に加える。試料を 8 0 ° C の温度、1 0 0 0 r p m で攪拌する。p-トルエンスルホン酸 (7 0 m g を酢酸エチル (1 m L) に溶解) を、この攪拌溶液に加え、それを一晩、8 0 ° C で攪拌して、白色固形物のスラリーを生成し、それを真空ろ過により単離して、表題化合物を得る。

40

【0085】

N- [3- [(4 a R, 7 a S)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4 a, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-d] [1, 3] チアジン-7 a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド：

50

トルエンスルホン酸の別の製造 A

N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド (9.5 g、19ミリモル) 及び p-トルエンスルホン酸 (3.80 g、19.8ミリモル) をテトラヒドロフラン (31 mL)、水 (7.9 mL)、及び 2-プロパノール (8.6 mL) に加える。この溶液を 40℃ に加熱する。加温された溶液に、およそ 3 時間かけて 2-プロパノール (200.0 mL) を加える。2-プロパノールの添加開始後すぐに、この混合物に表題化合物の一部 (500 mg、0.75ミリモル) を播種する。溶媒添加が完了した後、この混合物を 1~3 時間かけておよそ 20℃ にまで冷却する。およそ 20℃ からおよそ 55℃ にまで、2 時間の目標時間をかけてこの混合物を加熱する。1 時間、55℃ に温度を維持し、次いでおよそ 4 時間かけて約 20℃ まで冷却する。少なくとも 10 時間、およそ 20℃ でスラリーを攪拌する。このスラリーをろ過し、湿性ケーキを水 (57 mL) で洗浄する。生成物を 45℃、真空で少なくとも 10 時間乾燥させ、表題化合物を得る (10.4 g、81%)。ES/MS (m/z) : 500 (M+H)。

10

【0086】

N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド：トルエンスルホン酸の別の製造 B

20

水和された N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド (20.7 g) を、窒素バブラー、テフロン(登録商標)バナナ刃を有するガラスシャフトに付加された IKA (登録商標) 機械電動機/攪拌機、及びプログラム可能 J-KEM (登録商標) 温度制御装置に連結された熱電温度計を備えた 500 mL の三つ首丸底フラスコ中に、60:40 の THF:H₂O (85 mL) 中、170 rpm でスラリー化させる。p-トルエンスルホン酸一水和物 (7.6 g、1.03 当量) を、60:40 の THF:H₂O (20 mL) の混合液中に溶解させ、この溶液を、攪拌中の N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのスラリーに 23℃ で、一度にすべて加え、ほぼ瞬時に澄んだ赤色調の褐色溶液とさせる。次いで攪拌速度を 15 分かけて 200 rpm に上げ、水 (22 mL) をこの溶液に加え、次いで N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドトルエンスルホン酸 (750 mg、3 wt % の種投入量) を用いてそれに播種し、次いでさらに 15 分間、23℃ で攪拌する。6 時間かけて、水 (226 mL、総溶媒量は 353 mL；または 13.6 体積。最終溶媒比率は 17.5:82.5 の THF:H₂O) をスラリーに加え、次いでそれを一晩 (22 時間)、23℃ で攪拌する。スラリーを、バキュームを介してろ過し、15:85 の THF:H₂O (2×20 mL) を用いてリンスし、次いで 20 分間、生成物の湿性ケーキ中に形成される亀裂を手でびったりと押しながらバキューム上に置く。湿性固形物を約 72 時間、真空下、40℃ で乾燥させ、白色結晶質固形物として表題化合物を得る (24.07 g、90.0 wt %)。

30

40

【0087】

結晶質の N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミド；トルエンスルホン酸は、以下の表 3 に示されるように回析ピーク (2 シータ値

50

）を有するとして、特に、 0.2 度の回析角に対する許容誤差で、 19.6° 、 13.8° 、及び 18.5° からなる群から選択されるピークのうち1つ以上と組み合わせて、 5.0° の回析角 2θ でピークを有するとして、Cu K α 線を用いたXRDパターンにより特徴解析される。

表3：実施例1の結晶の粉末X線回析ピーク

【表3】

ピーク	角度 (2θ °) +/- 0.2°	相対強度 (最も高いピーク強度の%)
1	5.0	100.0
2	13.4	22.9
3	13.8	37.3
4	14.4	20.2
5	15.3	28.8
6	17.5	25.9
7	18.5	30.7
8	19.6	45.8
9	20.4	17.7
10	25.6	30.1

10

20

【0088】

約15%未満の相対湿度では、結晶形1のN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの遊離塩基が存在し、一方で約15%を超える相対湿度では、結晶形2のN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドが優勢を占めることが判明している。このような物理的不安定さは特に原薬または医薬品にとって望ましいものではなく、その両方とも固形状態の剤型に関し、調節管理下におかれなければならない。遊離塩基の結晶形とは対照的に、トシル酸塩は、広範な相対湿度(5~95%)にわたり改善された物理的安定性を有している。したがって、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩は、本質的に、その対応する遊離塩基の結晶形と関連した湿度依存性の相変態を回避する。さらにN-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩は、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのHCl塩に保持される溶媒が約7.7%であるのに比較し、結晶形に保持される溶媒の量は約1.3%とかなり低い量であることが判明している。遊離塩基が長期間の保存の間に相転移を経る可能性が増大することによって、例えば溶解性または溶出速度などの特性に変動が生じ得、医薬品の性能を損なう場合がある。また、結晶構造(複数含む)が非晶形へと崩壊するさらなるリスク、または欠陥及び障害が蓄積するさらなるリスクをもたらし、これによって化学的不安定さが生じ、製

30

40

50

剤の保存可能期限が低下する。

【0089】

In vitro アッセイの手順

In vitro の酵素アッセイ及び細胞アッセイを行うために、被験化合物を DMSO 中で調製し、10 mM のストック溶液を作製する。このストック溶液を 96 ウェルの丸底プレート中、DMSO で連続希釈し、最終化合物濃度は 10 mM ~ 0.05 nM の範囲で 10 点の希釈曲線を得て、その後に in vitro 酵素アッセイ及び全細胞アッセイを行う。

【0090】

In vitro プロテアーゼ阻害アッセイ

ヒト BACE1 の発現

ヒト BACE1 (アクセッション番号: AF190725) は、全脳 cDNA から RT-PCR によりクローニングされる。アミノ酸配列番号 1~460 に対応するヌクレオチド配列を、ヒト IgG₁ (Fc) ポリペプチドをコードする cDNA へと挿入する (Vasser, et al., Science, 286, 735-741 (1999))。この BACE1 (1~460) とヒト Fc の融合タンパク質を、huBACE1:Fc と名付け、pJB02 ベクター中に構築させる。ヒト BACE1 (1~460):Fc (huBACE1:Fc) を、HEK293 細胞中で一過性発現させる。各構築物の cDNA 250 µg を Fugene6 と混合し、1 リットルの HEK293 細胞に添加する。トランスフェクションの 4 日後、精製のために馴化培地を回収する。

【0091】

huBACE1:Fc の精製

huBACE1:Fc は、プロテイン A クロマトグラフィーにより精製される。酵素は、小分注物において、-80 °C で保存される。

【0092】

BACE1 FRET 分析

被験化合物の連続希釈は上述のように調製される。KH₂PO₄ 緩衝液中で化合物はさらに 20 倍に希釈される。各希釈の 10 µL を、反応混合液 (25 µL の 50 mM KH₂PO₄、pH 4.6、1 mM TRITON (登録商標) X-100、1 mg/mL ウシ血清アルブミン、及び 15 µM の FRET 基質) を含有する、対応するタンパク質低結合黒色プレートの A 列~H 列の各ウェルに加える (Yang, et al., J. Neurochemistry, 91(6) 1249-59 (2004) を参照のこと)。内容物を 10 分間、プレート振とう器上で良く混合する。KH₂PO₄ 緩衝液に溶解した 200 pM ヒト BACE1 (1~460):Fc (Vasser, et al., Science, 286, 735-741 (1999) を参照のこと) の 15 µL を、基質と被験化合物を含有するプレートに加え、反応を開始させる。0 時点での混合物の RFU を、プレート振とう器上で軽く混合した後、励起波長 355 nm、及び発光波長 460 nm で記録する。反応プレートをアルミホイルで覆い、16~24 時間、室温で、加湿された暗いオープン内で維持する。インキュベーション終了時の RFU を、0 時点で用いられたものと同じ励起及び発光の設定で記録する。0 時点と、インキュベーション終了時の RFU の差は、化合物処置下での BACE1 活性を表す。RFU の差は、阻害剤濃度に対してプロットされ、曲線は、4 パラメーターロジスティック方程式に適合され、EC₅₀ 値及び IC₅₀ 値を得る (Sinha, et al., Nature, 402, 537-540 (2000) を参照のこと)。

【0093】

製造 46 の化合物は、原則的に上述のように検証され、0.615 nM の BACE1 IC₅₀ (±0.101、n=5) [平均±SEM; SEM=平均標準誤差] を示した。このデータは、製造 46 の化合物が、in vitro で精製組み換え BACE1 酵素活性を阻害したことを示す。

【0094】

PDAPP 初代神経細胞分析

また、確証的全細胞分析を、PDAPP トランスジェニック胎児マウスから作製された

10

20

30

40

50

初代神経細胞培養中で行う。初代皮質神経細胞は、胎児16日目のPDAPPの胚から調製され、96ウェルプレート中で培養される（10%FBSを添加したDMEM/F12（1：1）中、 1.5×10^4 細胞/ウェル）。in vitroで2日後、培養培地を、B27サプリメント及び2 μ M（最終）のAra-C（Sigma社、C1768）を含有する無血清DMEM/F12（1：1）と置き換える。in vitroで5日目、神経細胞を37℃で24時間、所望される濃度の阻害剤（DMSO希釈されている）の存在下／非存在下でインキュベートする。インキュベーション終了時、馴化培地を、たとえばAベータペプチドの分析により、ベータセクレターゼ活性の兆候に関して分析する。総Aベータペプチド（Aベータ1-x）を、捕捉抗体としてモノクローナル抗体266を、及び報告抗体としてビオチニル化3D6を用いたサンドイッチELISAにより計測する。あるいは、Aベータ1～40ペプチド及びAベータ1～42ペプチドを、Aベータ1～40に対する捕捉抗体としてモノクローナル抗体2G3を、Aベータ1～42に対する捕捉抗体としてモノクローナル抗体21F12を用いたサンドイッチELISAにより計測する。Aベータ1～40及びAベータ1～42の両方のELISAとも、報告抗体としてビオチニル化3D6を使用する。化合物処置後の馴化培地中に放出されたAベータの濃度は、かかる条件下でのBACE1活性に相当する。10点阻害曲線をプロットし、及び4パラメーターロジスティック方程式に適合させることにより、Aベータ低減効果に対するEC₅₀値及びIC₅₀値が得られる。製造46の化合物は原則的に上述のように検証され、Aベータ低減効果に関し以下の活性を示した。

表4

【表4】

製造	PDAPP神経細胞 A-ベータ (1~40) ELISA A IC ₅₀ (nM)	PDAPP神経細胞A -ベータ (1~42) ELISA A IC ₅₀ (nM)
46	0.275 (± 0.176 , n=4)	0.228 (± 0.244 , n=3)

平均 $\pm$ SEM；SEM＝平均の標準誤差。

【0095】

これらのデータから、製造46の化合物は全細胞において、Aベータ産生を阻害することが示される。

【0096】

ベータセクレターゼのIn vivo阻害

マウス、モルモット、イヌ、及びサルをはじめとする数種類の動物モデルを用いて、化合物処置後のベータセクレターゼ活性のin vivoでの阻害に関しスクリーニングを行ってもよい。本発明に用いられる動物は、野生型動物であっても、トランスジェニック動物であっても、または遺伝子ノックアウト動物であってもよい。たとえば、Games et al., Nature 373, 523-527 (1995)に記載されるように作製されるPDAPPマウスモデル、ならびに他の非トランスジェニック動物または遺伝子ノックアウト動物が、阻害化合物の存在下での、Aベータ及びsAPPベータ産生のin vivo阻害の解析に有用である。一般的に、2～12か月齢のPDAPPマウス、遺伝子ノックアウトマウス、または非トランスジェニック動物に、たとえばトウモロコシ油、シクロデキストラン、リン酸緩衝液、PHARMASOLVE（登録商標）、または他の適切なビヒクルなどのビヒクル内に製剤化された化合物が投与される。化合物投与の1～24時間後、動物は殺処分さ

れ、脳ならびに脳脊髄液及び血漿が、A ベータ、C 9 9、及び s A P P 断片の解析のために回収される (May, et al., Journal of Neuroscience, 31, 16507-16516 (2011) 参照)。

【0097】

標準的な *in vivo* 薬理学的実験に対し、動物は、様々な濃度の化合物を用いて投与され、同時に投与されたビヒクル処置対照群と比較される。基準値を確立するための 0 時点から始まり、実験経過の間、脳組織、血漿、または脳脊髄液が選択された動物から採取される。化合物または適切なビヒクルが、他の群に投与され、投与後、様々な時点で殺処分される。脳組織、血漿、または脳脊髄液は選択された動物から採取され、A ベータペプチド、s A P P ベータ、及び他の A P P 断片をはじめとする A P P 開裂産物の存在に関し、たとえば特異的サンドイッチ E L I S A 分析などにより解析される。検証期間の終了時に動物は殺処分され、必要に応じて、脳組織、血漿または脳脊髄液が A ベータペプチド、C 9 9、及び s A P P ベータの存在に関し解析される。A P P トランスジェニック動物の脳組織もまた、化合物処置後のベータアミロイドプラークの量に関し解析されてもよい。本明細書において用いられる場合、「A ベータ 1-x ペプチド」とは、1 残基から始まり、28 残基超の C 末端で終わる A ベータ種の総和を指す。これにより A ベータ種の大部分が検出され、しばしば、「総 A ベータ」とも呼称される。

10

【0098】

阻害化合物を投与される動物 (P D A P P もしくは他の A P P トランスジェニックマウス、または非トランスジェニックマウス) は、ビヒクル処置対照またはゼロ時対照と比較し、脳組織、血漿、または脳脊髄液中で、A ベータまたは s A P P ベータの低下を示すことができ、及び脳組織におけるベータアミロイドプラークの減少を示すことができる。製造 46 に関し、0.3、1、または 3 mg/kg の化合物の経口投与の 3 時間後、A ベータ 1-x ペプチド値は、ビヒクル処置マウスと比較し、それぞれ脳の海馬においておよそ 31%、39%、及び 61% 低下し、大脳皮質においておよそ 28%、42%、及び 64% 低下する。

20

【0099】

in vitro での B A C E 酵素に対する製造 46 の活性を考慮すると、これら A ベータ低減効果は *in vivo* での B A C E 阻害と一致しており、さらには、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドの C N S 浸透が示唆される。

30

【手続補正書】

【提出日】令和1年5月9日(2019.5.9)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩である化合物。

【請求項2】

請求項1に記載のトシル酸塩の結晶形。

【請求項3】

0.2度の回析角に対する許容誤差で、19.6°、13.8°、及び18.5°から

なる群から選択されるピークのうち1つ以上と組み合わせて、5.0°の回析角2シートでのX線回析スペクトラムにおける実質的なピークにより特徴づけられる、請求項1に記載のトシル酸塩または請求項2に記載の結晶形。

【請求項4】

アルツハイマー病を治療するための医薬組成物であって、請求項1もしくは3に記載の化合物または請求項2もしくは3に記載の結晶形を含む、組成物。

【請求項5】

軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行を治療するための医薬組成物であって、請求項1もしくは3に記載の化合物または請求項2もしくは3に記載の結晶形を含む、組成物。

【請求項6】

治療における使用のための、請求項1もしくは3に記載の化合物または請求項2もしくは3に記載の結晶形。

【請求項7】

アルツハイマー病の治療における使用のための、請求項1もしくは3に記載の化合物または請求項2もしくは3に記載の結晶形。

【請求項8】

軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行の治療における使用のための、請求項1もしくは3に記載の化合物または請求項2もしくは3に記載の結晶形。

【請求項9】

1つ以上の薬剤的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤と、請求項1もしくは3に記載の化合物または請求項2もしくは3に記載の結晶形を含む、医薬組成物。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0099

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0099】

*in vitro*でのBACE酵素に対する製造46の活性を考慮すると、これらAベータ低減効果は*in vivo*でのBACE阻害と一致しており、さらには、N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのCNS浸透が示唆される。

本発明は、以下の態様を含む。

[1]

N-[3-[(4aR, 7aS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4a, 5, 7-テトラヒドロピロロ[3, 4-d][1, 3]チアジン-7a-イル]-4-フルオロフェニル]-5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩である化合物。

[2]

結晶質である[1]に記載のトシル酸塩。

[3]

0.2度の回析角に対する許容誤差で、19.6°、13.8°、及び18.5°からなる群から選択されるピークのうち1つ以上と組み合わせて、5.0°の回析角2シートでのX線回析スペクトラムにおける実質的なピークにより特徴づけられる、[1]または[2]のいずれかに記載のトシル酸塩。

[4]

〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の化合物の有効量を、かかる治療を必要としている患者に投与することを含む、患者のアルツハイマー病を治療する方法。

〔５〕

〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の化合物の有効量を、かかる治療を必要としている患者に投与することを含む、患者の軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行を治療する方法。

〔６〕

治療における使用のための、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の化合物。

〔７〕

アルツハイマー病の治療における使用のための、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の化合物。

〔８〕

軽度認知機能障害からアルツハイマー病への進行の治療における使用のための、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の化合物。

〔９〕

１つ以上の薬剂的に許容可能な担体、希釈剤、または賦形剤と、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の化合物を含む、医薬組成物。

フロントページの続き

(72)発明者 コーテス, デイビッド アンドリュー

アメリカ合衆国 インディアナ州 46206-6288, インディアナポリス, ピー. オー. ボックス 6288, イーライ リリー アンド カンパニー内

(72)発明者 ウルフエンジェル, クライグ ダニエル

アメリカ合衆国 インディアナ州 46206-6288, インディアナポリス, ピー. オー. ボックス 6288, イーライ リリー アンド カンパニー内

Fターム(参考) 4C072 AA01 BB02 CC02 CC16 EE16 FF03 GG01 GG08 HH02 HH07

JJ09 UU01

4C086 AA01 AA02 AA03 CB29 GA14 GA15 MA01 MA04 NA03 NA14

ZA15 ZA16 ZC20

(54)【発明の名称】 N- [3- [(4AR, 7AS)-2-アミノ-6-(5-フルオロピリミジン-2-イル)-4, 4A, 5, 7-テトラヒドロピロロ [3, 4-D] [1, 3] チアジン-7A-イル] -4-フルオロフェニル] -5-メトキシピラジン-2-カルボキサミドのトシル酸塩

【外国語明細書】
2019142902000001.pdf