

明 細 書

発明の名称：

(6 S, 9 a S) - N - ベンジル - 6 - [(4 - ヒドロキシフェニル) メチル] - 4, 7 - ジオキソ - 8 - ({ 6 - [3 - (ピペラジーン - 1 - イル) アゼチジン - 1 - イル] ピリジン - 2 - イル } メチル) - 2 - (プロプ - 2 - エン - 1 - イル) - オクタヒドロ - 1 H - ピラジノ [2, 1 - c] [1, 2, 4] トリアジン - 1 - カルボキサミド化合物の結晶

技術分野

[0001] 本発明は、(6 S, 9 a S) - N - ベンジル - 6 - [(4 - ヒドロキシフェニル) メチル] - 4, 7 - ジオキソ - 8 - ({ 6 - [3 - (ピペラジーン - 1 - イル) アゼチジン - 1 - イル] ピリジン - 2 - イル } メチル) - 2 - (プロプ - 2 - エン - 1 - イル) - オクタヒドロ - 1 H - ピラジノ [2, 1 - c] [1, 2, 4] トリアジン - 1 - カルボキサミド化合物の結晶に関する。

背景技術

[0002] Wnt signaling pathway は生物種間の差によらず保存され、生体の発生、分化および維持に関わる重要な経路として明らかとされている。しかし、昨今、その恒常的な活性化が、線維症やがんの悪性化の進展に関与しているとの報告がなされている。中でも大腸癌、黒色腫、子宮内膜癌、肝臓癌、前立腺癌などでは、adenomatous polyposis coli (APC) や β - カテニンのそれぞれ抑制型変異、活性化型変異などによって Wnt signaling pathway が恒常的に活性化されていることが知られている。また膵臓癌や血液癌、肝癌などでは既存の抗腫瘍剤による治療後に Wnt signaling pathway が活性化されてくることが知られている。

[0003] 非特許文献 1 および 2 には、Wnt signaling pathway を阻害すると、優れた抗腫瘍活性を示すことが記載されており、非特許文

献12、13および14には、Wnt signaling pathwayを阻害することで線維症に対して優れた効果を示すことが記載されている。腫瘍治療や線維症治療の新たな標的としてWnt signaling pathwayが着目されつつある。

[0004] 非特許文献3、4、5、6、7、8、9、10および11には、Wnt signaling pathwayを阻害する化合物または抗体が記載されており、これらはTankyrase、Traf2 and Nck-interacting kinase (TNIK)、Porcupine、Frizzled Receptorなどに対して作用することが報告されている。

[0005] また、オクタヒドロ-1H-ピラジノ[2,1-c][1,2,4]トリアジン骨格を有する化合物は、Wnt signaling pathwayのモジュレータとして知られており、癌や線維症などの疾患との関連が指摘されている（特許文献1～3）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2009/051397号

特許文献2：米国特許出願公開第2010/0286094号明細書

特許文献3：国際公開第2009/148192号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nick Barker et al., “Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics”, Nature reviews Drug discovery 2006 Dec; 5 (12): 997-1014.

非特許文献2：Katayoon H. Emami et al., “A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription”, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA., 2004, 101 (34), p. 12682-12687

非特許文献3: Baozhi Chen et al., "Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer", Nat Chem Biol., 2009, 5 (2), p. 100-107.

非特許文献4: Shih-Min A. Huang et al., "Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling", Nature, 2009, 461, p. 614-620.

非特許文献5: Lari Lehtio et al., "Tankyrases as drug targets", The FEBS Journal, 2013, 280, 3576-3593.

非特許文献6: Miki Shitashige et al., "Traf2- and Nck-Interacting Kinase Is Essential for Wnt Signaling and Colorectal Cancer Growth", Cancer Res., 2010, 70 (12), 5024-5033.

非特許文献7: Austin Gurney et al., "Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2012, 109 (29), 11717-11722.

非特許文献8: Xiaomo Jiang et al., "Inactivating mutations of RNF43 confer W

nt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2013, 110 (31), 12649–12654.

非特許文献9: Jo Waaler et al., “Novel Synthetic Antagonists of Canonical Wnt Signaling Inhibit Colorectal Cancer Cell Growth”, Cancer Res, 2011, 71 (1), 197–205.

非特許文献10: H Yao et al., “AV-65, a novel Wnt/ β -catenin signal inhibitor, successfully suppresses progression of multiple myeloma in a mouse model”, Blood Cancer Journal, 2011, 1, e43.

非特許文献11: De Robertis A et al., “Identification and characterization of a small-molecule inhibitor of Wnt signaling in glioblastoma cells”, Mol Cancer Ther., 2013, 12 (7), 1180–1189.

非特許文献12: Anna P. Lam et al., “ β -catenin signaling: a novel mediator of fibrosis and potential therapeutic target”, Curr Opin Rheumatol. 2011 November ; 23 (6) : 562–567.

非特許文献13: Sha Hao et al., “Targeted Inhibition of β -Catenin/CBP Signali

ng Ameliorates Renal Interstitial Fibrosis", J. Am. Soc. Nephrol. 22 : 1642-1653, 2011.

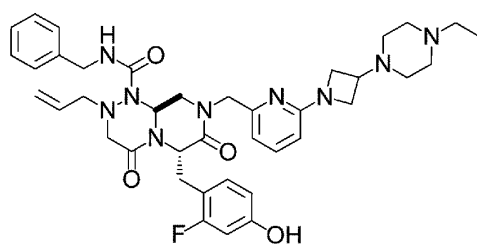
非特許文献14: William R. Henderson, Jr. et al., "Inhibition of Wnt/ β -catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis", Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2010, 107 (32), 14309-14314.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 下記式で表される化合物である、(6S, 9aS) - N-ベンジル-8-({6-[3-(4-エチルピペラジン-1-イル)アゼチジン-1-イル]ピリジン-2-イル}メチル)-6-(2-フルオロ-4-ヒドロキシベンジル)-4,7-ジオキソ-2-(プロプ-2-エン-1-イル)ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ[2,1-c][1,2,4]トリアジン-1(6H)-カルボキサミド(以下、「化合物1」と称す。)は、Wnt Pathway modulating作用を有する。

[化1]



一般に、医薬品として用いられる化合物およびその塩ならびにそれらの結晶の物性は、薬物のバイオアベイラビリティー、原薬の純度、製剤の処方などに大きな影響を与える。したがって、本発明の課題は、医薬品の原薬としての利用可能性を有する化合物1の結晶を提供することにある。

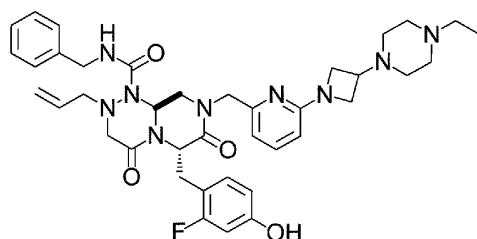
課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、鋭意努力の結果、本発明を完成させた。

すなわち、本発明は、以下の〔１〕～〔１２〕を提供する。

〔１〕（６Ｓ，９ａＳ）－Ｎ－ベンジル－８－（（６－〔３－（４－エチルピペラジン－１－イル）アゼチジン－１－イル〕ピリジン－２－イル）メチル）－６－（２－フルオロ－４－ヒドロキシベンジル）－４，７－ジオキソ－２－（プロプ－２－エン－１－イル）ヘキサヒドロ－２Ｈ－ピラジノ〔２，１－ｃ〕〔１，２，４〕トリアジン－１（６Ｈ）－カルボキサミドの結晶。

〔化２〕



〔２〕粉末Ｘ線回折において、回折角度（ $2\theta \pm 0.2^\circ$ ） 5.8° に回折ピークを有する、〔１〕に記載の結晶。

〔３〕粉末Ｘ線回折において、回折角度（ $2\theta \pm 0.2^\circ$ ） 5.8° 、 6.4° および 10.1° に回折ピークを有する、〔１〕に記載の結晶。

〔４〕粉末Ｘ線回折において、さらに回折角度（ $2\theta \pm 0.2^\circ$ ） 8.0° および 12.8° に回折ピークを有する、〔３〕に記載の結晶。

〔５〕粉末Ｘ線回折において、さらに回折角度（ $2\theta \pm 0.2^\circ$ ） 14.2° 、 16.0° 、 18.9° 、 19.7° および 23.1° に回折ピークを有する、〔４〕に記載の結晶。

〔６〕 ^{13}C 固体ＮＭＲスペクトルにおいて、化学シフト（ $\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$ ） 154.7 ppm にピークを有する、（６Ｓ，９ａＳ）－Ｎ－ベンジル－８－（（６－〔３－（４－エチルピペラジン－１－イル）アゼチジン－１－イル〕ピリジン－２－イル）メチル）－６－（２－フルオロ－４－ヒドロキ

シベンジル) - 4, 7-ジオキソ-2-(プロプ-2-エン-1-イル)ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ[2, 1-c][1, 2, 4]トリアジン-1(6H)-カルボキサミドの結晶。

[7] ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、さらに化学シフト ($\delta \pm 0.5$ ppm) 141.1 ppmおよび158.1 ppmにピークを有する、[6]の結晶。

[8] ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、さらに化学シフト ($\delta \pm 0.5$ ppm) 134.0 ppmおよび165.1 ppmにピークを有する、[7]記載の結晶。

[9] ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、さらに化学シフト ($\delta \pm 0.5$ ppm) 12.6 ppm、55.5 ppmおよび118.5 ppmにピークを有する、[8]記載の結晶。

[10] 図4で示される粉末X線パターンと実質的に同一の粉末X線回折パターンを有する、(6S, 9aS)-N-ベンジル-8-({6-[3-(4-エチルピペラジン-1-イル)アゼチジン-1-イル]ピリジン-2-イル}メチル)-6-(2-フルオロ-4-ヒドロキシベンジル)-4, 7-ジオキソ-2-(プロプ-2-エン-1-イル)ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ[2, 1-c][1, 2, 4]トリアジン-1(6H)-カルボキサミドの結晶。

[11] 図6で示される ^{13}C 固体NMRスペクトルと実質的に同一の ^{13}C 固体NMRスペクトルを有する、(6S, 9aS)-N-ベンジル-8-({6-[3-(4-エチルピペラジン-1-イル)アゼチジン-1-イル]ピリジン-2-イル}メチル)-6-(2-フルオロ-4-ヒドロキシベンジル)-4, 7-ジオキソ-2-(プロプ-2-エン-1-イル)ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ[2, 1-c][1, 2, 4]トリアジン-1(6H)-カルボキサミドの結晶。

[12] [1] ~ [11]のいずれかーに記載の結晶を含む、医薬組成物。

発明の効果

[0010] 本発明にかかる化合物 1 の結晶は、実施例で示されるような性状であり、医薬品の原薬としての利用可能性を有している。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図 1 は、試験例 2 の結果を示すグラフである。縦軸はマウス 1 匹あたりのポリープの数を示す。

[図2]図 2 は、試験例 3 の結果を示すグラフである。横軸は経過日数を示し、縦軸は 0 日目の腫瘍体積に対する相対的腫瘍体積 (R T V) を示す。

[図3]図 3 は、試験例 3 の結果を示すグラフである。横軸は経過日数を示し、縦軸は 0 日目の体重に対する相対的体重 (R B W) を示す。

[図4]図 4 は、試験例 4 における化合物 1 の結晶の粉末 X 線回折パターンである。横軸は回折角 (2θ)、縦軸はピーク強度を示す。

[図5]図 5 は、試験例 5 の結果を示すグラフである。横軸は温度を示し、左縦軸は熱重量分析 (T G) における変化量、右縦軸は示差熱分析 (D T A) における変化量を示す。

[図6]図 6 は、試験例 6 における化合物 1 の結晶の ^{13}C 固体 NMR スペクトルである。横軸は化学シフト (δ)、縦軸はピーク強度を示す

発明を実施するための形態

[0012] 本明細書において、好ましい結晶としては、粉末 X 線回折において、回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 5.8° に回折ピークを有する、化合物 1 の結晶；

回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 5.8° 、 6.4° および 10.1° に回折ピークを有する、化合物 1 の結晶；

回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 5.8° 、 6.4° 、 8.0° 、 10.1° および 12.8° に回折ピークを有する、化合物 1 の結晶；

回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 5.8° 、 6.4° 、 8.0° 、 10.1° 、 12.8° 、 14.2° 、 16.0° 、 18.9° 、 19.7° および 23.1° に回折ピークを有する、化合物 1 の結晶などを挙げることができる。

- [0013] 上記記載の粉末X線回折における回折ピークは、化合物1の結晶にそれぞれ特有なものであり、当該結晶に特徴的な回折ピークである。
- [0014] 一般に、粉末X線回折における回折角度 (2θ) は $\pm 0.2^\circ$ の範囲内で誤差が生じ得るため、上記の回折角度の値は $\pm 0.2^\circ$ 程度の範囲内の数値も含むものとして理解される必要がある。したがって、粉末X線回折におけるピークの回折角度が完全に一致する結晶だけでなく、ピークの回折角度が $\pm 0.2^\circ$ 程度の誤差で一致する結晶も同一であり、本発明に含まれる。
- [0015] 本明細書において、例えば、「回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 5.8° に回折ピークを有する」とは、「回折角度 (2θ) $5.6^\circ \sim 6.0^\circ$ に回折ピークを有する」ということを意味し、その他の回折角度の場合も同様である。
- [0016] また、一般に、粉末X線回折における回折角度 (2θ) のピーク強度または半値幅は、結晶形が同一であっても、測定条件の違いや測定試料として用いる粉末結晶の各粒子の大きさや形状のばらつきにより、測定ごとに異なり、必ずしも一定のピーク強度または半値幅が常に示されるとは限らない。そのため、粉末X線回折パターンの比較において、同じ回折角度 (2θ) で、そのピーク強度または半値幅に違いがあっても、その違いは、測定された結晶形が互いに異なることを意味するものではない。したがって、本発明の特定の結晶に特徴的な回折ピークに対して、そのような違いを有する粉末X線回折パターンを示す当該化合物の結晶は、本発明の化合物の結晶と同一の結晶形であることを意味する。また、本明細書において「図4で示される粉末X線回折パターンと実質的に同一の粉末X線回折パターンを有する」とは、ある特徴的な回折ピークを有する粉末X線回折パターンが、図4で示される粉末X線回折パターンに完全に一致する場合だけでなく、ピーク強度または半値幅が異なるか、特徴的な回折ピークの回折角度が $\pm 0.2^\circ$ の誤差範囲で一致する場合も、図4で示される粉末X線回折パターンと同一の粉末X線回折パターンであることを意味する。したがって、このような粉末X線回折パターンを有する結晶は全て、本発明の結晶と同一の結晶であることを意味

する。

[0017] 本明細書において、好ましい結晶としては、 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、

化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 154.7 ppm にピークを有する、化合物1の結晶；

化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 141.1 ppm , 154.7 ppm および 158.1 ppm にピークを有する、化合物1の結晶；

化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 134.0 ppm , 141.1 ppm , 154.7 ppm , 158.1 ppm , および 165.1 ppm にピークを有する、化合物1の結晶；

化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 12.6 ppm , 55.5 ppm , 118.5 ppm , 134.0 ppm , 141.1 ppm , 154.7 ppm , 158.1 ppm , および 165.1 ppm にピークを有する、化合物1の結晶などを挙げることができる。

[0018] 上記記載の ^{13}C 固体NMRスペクトルにおけるピークは、化合物1の結晶にそれぞれ特有なものであり、当該結晶に特徴的なピークである。

[0019] 本明細書において、「化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 12.6 ppm , 55.5 ppm , 118.5 ppm , 134.0 ppm , 141.1 ppm , 154.7 ppm , 158.1 ppm , および 165.1 ppm 」とは、「通常の測定条件または本明細書と実質的に同一の条件にて ^{13}C 固体NMRスペクトル測定を行い、それぞれ、化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 12.6 ppm , 55.5 ppm , 118.5 ppm , 134.0 ppm , 141.1 ppm , 154.7 ppm , 158.1 ppm , および 165.1 ppm と実質的に同等なピークを有すること」を意味する。

[0020] 「実質的に同等なピークを有する」か否かの判断に際して、一般に、 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおける化学シフト (δ) は、 $\pm 0.5 \text{ ppm}$ の範囲内で誤差が生じ得るため、上記の化学シフトの値は、 $\pm 0.5 \text{ ppm}$ 程度の範囲内の数値も含むものとして理解される必要がある。したがって、 ^{13}C 固

体NMRスペクトルにおける化学シフトが完全に一致する結晶だけでなく、化学シフトが ± 0.5 ppm程度の誤差で一致する結晶も本発明に含まれる。それ故に、本明細書において、例えば、「化学シフト ($\delta \pm 0.5$ ppm) 12.6 ppmにピークを有する」とは、「化学シフト (δ) 12.1 ppm $\sim$ 13.1 ppmにピークを有する」ことを意味し、その他の ^{13}C 固体NMRスペクトルにおける化学シフトの場合も同様である。また、「図6で示される ^{13}C 固体NMRスペクトルと実質的に同一の ^{13}C 固体NMRスペクトルを有する結晶」とは、ある化学シフトのピークを有する ^{13}C 固体NMRスペクトルが、図6で示される ^{13}C 固体NMRスペクトルと完全に一致する場合だけでなく、ピーク強度が異なるか、特徴的なピークが化学シフト ± 0.5 ppm程度の範囲内で一致する場合も、図6で示される ^{13}C 固体NMRスペクトルと同一の ^{13}C 固体NMRスペクトルを有する結晶であることを意味する。したがって、このような ^{13}C 固体NMRスペクトルを有する結晶は全て、本発明の結晶と同一の結晶であることを意味する。

[0021] 以下に、本発明の一実施形態である化合物1の結晶等の製造方法について説明する。

[0022] 化合物1の製造

化合物1は、後述する実施例、製造例に記載の方法で合成することができる。

[0023] 化合物1の結晶の製造方法

化合物1の結晶は、上述の化合物1の製造方法により製造することができ、または、化合物1を、溶媒中で加熱溶解し、攪拌下冷却して晶析することにより、製造することもできる。

[0024] 晶析に使用する化合物1は、どのような形態であってもよく、溶媒和物もしくは水和物または無水物でもよく、非晶質でも結晶質（複数の結晶多形からなるものを含む）でもよく、これらの混合物でもよいが、好ましくは無水物である。

[0025] 晶析に使用する溶媒は、例えば、メタノール、エタノール、1-プロパノ

ール、2-プロパノール等のアルコール系溶媒；アセトニトリル；N,N-ジメチルホルムアミド等のアミド系溶媒；酢酸エチル、酢酸イソプロピル等のエステル系溶媒；ヘキサン、ヘプタン等の飽和炭化水素系溶媒；アセトン、2-ブタノン等のケトン系溶媒；t-ブチルメチルエーテル等のエーテル系溶媒または水を挙げることができる。また、これらの溶媒は単独で使用してもよく、2種以上を混合して使用してもよい。2種以上の溶媒を混合して晶析を行う場合には、例えば、ヘプタン及び1-プロパノールを組み合わせ使用することが好ましい。

[0026] 溶媒の使用量は、化合物1が加熱により溶解する量または懸濁液が攪拌可能となる量を下限とし、結晶の収量が著しく低下しない量を上限として適宜選択することができる。

[0027] 上記の方法により得られた結晶は単一の結晶形となる。この結晶形は安定であって、容易に他の結晶形や非晶質に転移することがなく、良好な物性を有しており、製剤化にも適している。

[0028] 晶析において、種結晶（所望の化合物1の結晶など）を加えても、加えなくてもよい。種結晶を加える際の温度は、特に限定されないが、好ましくは0～100℃である。

[0029] 化合物1を加熱して溶解する場合の温度は、溶媒に応じて化合物1が溶解する温度を適宜選択すればよいが、好ましくは50℃から再結晶溶媒が還流を開始する温度の範囲であり、より好ましくは60～100℃である。

[0030] 晶析時の冷却は、急冷すると態様の異なる結晶（多形）を含むものを与えるので、結晶の品質や粒度等への影響を考慮して適宜冷却速度を調整して実施することが望ましく、好ましくは、例えば5～40℃／時間の速度での冷却である。より好ましくは、例えば5～25℃／時間の速度での冷却である。

[0031] また、最終的な晶析温度は、結晶の収量と品質等から適宜選択することができるが、好ましくは-25～30℃である。

[0032] 晶析した結晶を通常の濾過操作で分離し、必要に応じて別した結晶を溶

媒で洗浄し、さらにこれを乾燥して、目的の結晶を得ることができる。結晶の洗浄に使用する溶媒には、晶析溶媒と同様のものを使用できる。このような溶媒としては、好ましくは、例えば、エタノール、アセトン、2-ブタノン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、t-ブチルメチルエーテル、ヘキサン、ヘプタン等を挙げることができる。また、これらの溶媒は単独で使用してもよく、2種以上を混合して使用してもよい。

[0033] 濾過操作で分離した結晶は、適宜、大気下または窒素気流下に放置することにより、または加熱によって乾燥することができる。

[0034] 乾燥時間は、残留溶媒が所定の量を下回るまでの時間を製造量、乾燥装置、乾燥温度等に応じて適宜選択すればよい。また、乾燥は通風下でも減圧下でも行うことができる。減圧度は、製造量、乾燥装置、乾燥温度等に応じて適宜選択すればよい。得られた結晶は、乾燥後、必要に応じて大気中に放置することもできる。

[0035] 化合物1の結晶に、必要に応じて薬剤学的に許容できる添加物を添加して、医薬組成物を製造することができる。医薬組成物の剤形としては、例えば、経口剤（錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤、シロップ剤等）、注射剤（静脈内投与用、筋肉内投与用、皮下投与用、腹腔内投与用等）、外用剤（経皮吸収製剤（軟膏剤、貼付剤等）、点眼剤、点鼻剤、坐剤等）を挙げることができる。

[0036] これらの錠剤、カプセル剤、顆粒剤、粉末等の固形製剤は、通常0.001～99.5質量%、好ましくは0.001～90質量%の化合物1の結晶を含むことができる。

[0037] 経口用固形製剤を製造する場合には、化合物1の結晶に、必要に応じて、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤などを添加し、常法により錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤にすることができる。また、錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤等は必要に応じてコーティングを施してもよい。

[0038] 本発明にかかる医薬の投与量は、通常、症状、年齢、性別、体重等に応じて異なり、所望の効果を奏するのに十分な量であればよい。例えば、成人の

場合、1日あたり約0.1～5000mg（好ましくは0.5～1000mg）が、1日または複数日の間に1回または1日に2～6回に分けて使用される。

実施例

- [0039] 本発明にかかる化合物1の結晶は、例えば以下の製造例および実施例に記載した方法により製造することができる。ただし、これらは例示的なものであって、本発明にかかる化合物の結晶は如何なる場合も以下の具体例に限定されるものではない。
- [0040] 製造例および実施例中、特に記載がない場合は、シリカゲルカラムクロマトグラフィーに使用している精製用シリカゲルとしては、YMC GEL SILICA（YMC Co., Ltd、カタログコード：SL06152W）を用い、NHシリカゲルカラムクロマトグラフィーに使用している精製用シリカゲルは、NHシリカゲル（Fuji Silysia Chemical LTD.、カタログコード：DM2035）を用い、ODSシリカゲルカラムクロマトグラフィーに使用している精製用シリカゲルとしては、YAMAZEN GEL ODS-SM（YAMAZEN Corporation、カタログコード：W113、W116など）を用いた。また、シリカゲル薄層クロマトグラフィーに使用している精製用TLCプレートは、TLC Silica gel 60F₂₅₄（Merck KGaA、カタログコード：1.05715.0001）を用い、NHシリカゲル薄層クロマトグラフィーに使用している精製用TLCプレートは、NH SILICA GEL TLCプレート（Fuji Silysia Chemical LTD.、カタログコード：T050908）を用いた。
- [0041] 本明細書で用いられる略号は以下のとおりである。
- NMP：N-メチルピロリジノン
- THF：テトラヒドロフラン
- HATU：O-（7-アザベンゾトリアゾール-1-イル）-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェート

HBTU : O- (ベンゾトリアゾール-1-イル) -N, N, N', N'-
テトラメチルウロニウム ヘキサフルオロフォスフェート

TFA : トリフルオロ酢酸

DMF : N, N-ジメチルホルムアミド

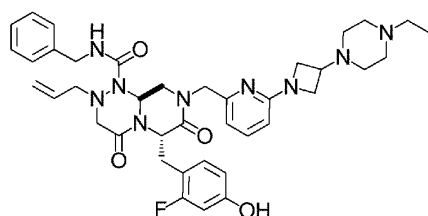
DMSO : ジメチルスルホキシド

[0042] $^1\text{H-NMR}$ (プロトン核磁気共鳴) スペクトルの化学シフトは、テトラメチルシランに対する δ 単位 (ppm) で記録され、カップリング定数はヘルツ (Hz) で記録されている。分裂パターンの略号は以下の通りである。s : シングレット、d : ダブルレット、t : トリプレット、q : カルテット、m : マルチプレット、br : ブロード。

[0043] [実施例 1]

(6S, 9aS) -N-ベンジル-8- ({6- [3- (4-エチルピペラジン-1-イル) アゼチジン-1-イル] ピリジン-2-イル} メチル) -6- (2-フルオロ-4-ヒドロキシベンジル) -4, 7-ジオキソ-2- (プロプ-2-エン-1-イル) ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ [2, 1-c] [1, 2, 4] トリアジン-1 (6H) -カルボキサミド

[化3]



製造例 1-1-6 に記載の (6S, 9aS) -N-ベンジル-6- ((2-フルオロ-4-ヒドロキシフェニル) メチル) -8- ((6-フルオロピリジン-2-イル) メチル) -4, 7-ジオキソ-2- (プロプ-2-エン-1-イル) -オクタヒドロ-1H-ピラジノ [2, 1-c] [1, 2, 4] トリアジン-1-カルボキサミド (397mg、0.689mmol) と NMP (10mL) の混合溶液に、室温で製造例 1-3-2 に記載の 1- (アゼチジン-3-イル) -4-エチルピペラジンとベンジルベンゼンの混合

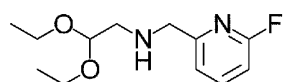
物（1.16 g）を加え、140℃にて12時間マイクロウェーブ照射した。室温まで冷却した後、反応混合物に水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（メタノール）で精製した後、更にNHシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール＝20：1）で精製し、標記化合物（402 mg、収率：80%）を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.00(3H, t, J=6.8 Hz), 2.10–2.65(10H, m), 3.10–3.21(2H, m), 3.41–3.74(8H, m), 3.84–3.89(1H, m), 3.95–4.05(2H, m), 4.17–4.23(2H, m), 4.51(1H, dd, J=6.8 Hz, 15.6 Hz), 4.95(1H, d, J=13.6 Hz), 5.20–5.30(3H, m), 5.50–5.60(1H, m), 5.70–5.80(1H, m), 5.82–5.87(1H, m), 6.24(1H, d, J=8.0 Hz), 6.41(1H, dd, J=2.0 Hz, 11.2 Hz), 6.47(1H, dd, J=8.8 Hz, 8.8 Hz), 6.69(1H, d, J=7.2 Hz), 6.80–6.86(1H, m), 7.20–7.31(3H, m), 7.35–7.46(3H, m).

ESI-MS(m/z): 726.57 [M+H]⁺.

[0044] [製造例1-1-1] (2,2-ジエトキシエチル)((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)アミン

[化4]



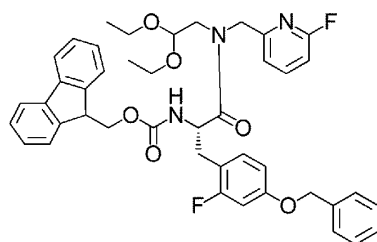
市販の2,2-ジエトキシエタン-1-アミン（926 μL、6.39 mmol）とTHF（10.0 mL）、酢酸（1.00 mL）の混合溶液に、室温で市販の6-フルオロピリジン-2-カルバルデヒド（800 mg、6.39 mmol）を加え、室温で25分撹拌した。続いて、トリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム（2.71 g、12.8 mmol）を室温に加え、1時間10分撹拌した。反応混合物に炭酸水素ナトリウムと水を加えて反応を止め、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣をNHシリカゲルカラムクロ

マトグラフィー（ヘプタン：酢酸エチル＝１：１）で精製した後、更にシリカゲルカラムクロマトグラフィー（酢酸エチル：メタノール＝２０：１）で精製し、標記化合物（１．１４ｇ、収率：７４％）を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.22(6H, t, J=7.2 Hz), 2.76(2H, d, J=5.5 Hz), 3.50-3.61(2H, m), 3.65-3.76(2H, m), 3.89(2H, s), 4.64(1H, t, J=5.5 Hz), 6.80(1H, dd, J=2.8 Hz, 8.2 Hz), 7.22(1H, dd, J=2.4 Hz, 7.3 Hz), 7.74(1H, q, J=7.9 Hz).

[0045] [製造例 1-1-2] 9H-フルオレン-9-イルメチル N-((1S)-2-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-1-(2,2-ジエトキシエチル)((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)カルバモイル)エチル)カーバメート

[化5]

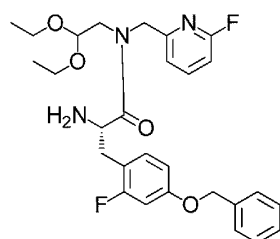


製造例 1-1-1 に記載の (2,2-ジエトキシエチル)((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)アミン (3.50 g、14.4 mmol) とジクロロメタン (25 mL) の混合溶液に、室温で製造例 1-2-7 に記載の (2S)-3-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-2-(((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ)プロパノイックアシッド (7.76 g、15.1 mmol)、N-メチルモルホリン (2.06 mL、18.7 mmol)、HATU (6.04 g、15.8 mmol) を加え、室温で 13 時間撹拌した。反応混合物に炭酸水素ナトリウムと水を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、標記化合物の粗体 (14.4 g) を得た。これ以上精製することなく、次の反応に用いた。

ESI-MS(m/z): 758.50 $[M+Na]^+$.

[0046] [製造例 1-1-3] (2S)-2-アミノ-3-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-N-(2,2-ジエトキシエチル)-N-((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)プロパンアミド

[化6]

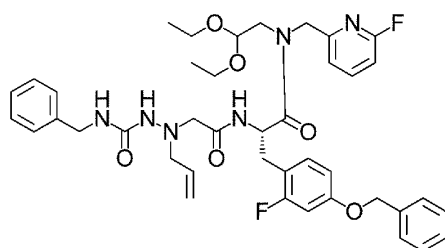


製造例 1-1-2 に記載の 9H-フルオレン-9-イルメチル N-((1S)-2-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-1-((2,2-ジエトキシエチル)((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)カルバモイル)エチル)カーバメート (14.4 g) と THF (30 mL) の混合溶液に、室温でジエチルアミン (5.27 mL、50.4 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣にメタノール、水、ヘプタンを加え分配した。水層をヘプタンで洗浄した後、減圧下濃縮した。残渣に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン：酢酸エチル=1：1 ついで酢酸エチル) で精製し、標記化合物 (6.87 g、収率：93%) を得た。

ESI-MS(m/z): 514.32 $[M+H]^+$.

[0047] [製造例 1-1-4] (2S)-2-(2-((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)アミノ)-3-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-N-(2,2-ジエトキシエチル)-N-((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)プロパンアミド

[化7]

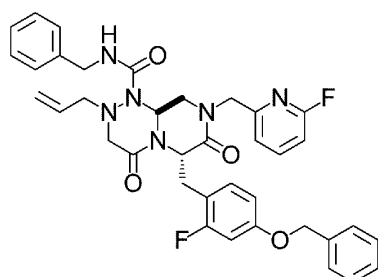


製造例 1-1-3 に記載の (2S)-2-アミノ-3-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-N-(2,2-ジエトキシエチル)-N-((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)プロパンアミド (4.87 g、9.48 mmol) とジクロロメタン (100 mL) の混合溶液に、WO 2009/148192 に記載の 2-((ベンジルカルバモイル)アミノ)(プロプ-2-エン-1-イル)アミノ)アセティックアシッド (2.62 g、9.95 mmol)、トリエチルアミン (2.64 mL、19.0 mmol) 及び HBTU (3.96 g、10.4 mmol) を室温に加え、室温で 1 時間攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/メタノール = 30 : 1) で精製し、標記化合物 (7.28 g、収率 : 定量的) を得た。

ESI-MS(m/z): 759.43 [M+H]⁺.

[0048] [製造例 1-1-5] (6S, 9aS)-N-ベンジル-6-((4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)メチル)-8-((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)-4,7-ジオキソ-2-(プロプ-2-エン-1-イル)-オクタヒドロ-1H-ピラジノ [2,1-c] [1,2,4] トリアジン-1-カルボキサミド

[化8]

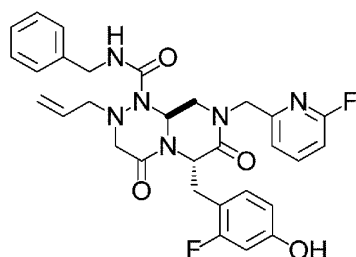


製造例 1-1-4 に記載の (2S)-2-(2-((ベンジルカルバモイル)アミノ)(プロプ-2-エン-1-イル)アミノ)アセトアミド)-3-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-N-(2,2-ジエトキシエチル)-N-((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)プロパンアミド (7.28 g、9.48 mmol) とギ酸 (50 mL) の混合溶液を室温で 15 時間 15 分攪拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣にアンモニア水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン：酢酸エチル=1：1) で精製し、標記化合物 (5.04 g、収率：80%) を得た。

ESI-MS(m/z): 667.39 [M+H]⁺.

[0049] [製造例 1-1-6] (6S, 9aS)-N-ベンジル-6-((2-フルオロ-4-ヒドロキシフェニル)メチル)-8-((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)-4,7-ジオキソ-2-(プロプ-2-エン-1-イル)-オクタヒドロ-1H-ピラジノ[2,1-c][1,2,4]トリアジン-1-カルボキサミド

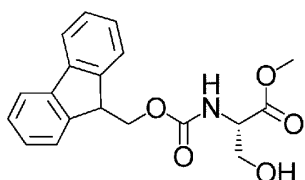
[化9]



製造例 1-1-5 に記載の (6S, 9aS) -N-ベンジル-6-((4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)メチル)-8-((6-フルオロピリジン-2-イル)メチル)-4,7-ジオキソ-2-(プロペ-2-エン-1-イル)-オクタヒドロ-1H-ピラジノ[2,1-c][1,2,4]トリアジン-1-カルボキサミド (5.04 g, 7.56 mmol) と TFA (20 mL) の混合溶液に、室温でチオアニソール (3.55 mL, 30.2 mmol) を加え、室温で 13 時間 50 分撹拌した。反応混合物を減圧下濃縮し、残渣に炭酸水素ナトリウムと水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル : メタノール = 20 : 1) で精製し、標記化合物 (4.34 g、収率 : 定量的) を得た。

ESI-MS(m/z): 577.31 [M+H]⁺.

[0050] [製造例 1-2-1] メチル (2S)-2-(((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヒドロキシプロパノエート [化10]



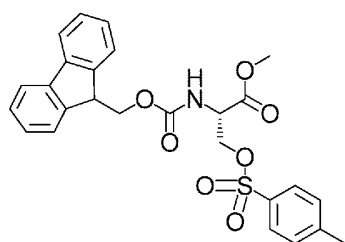
市販の L-セリン メチルエステル 塩酸塩 (10.0 g, 64.3 mmol) と 1,4-ジオキサン (15 mL)、水 (90 mL) の混合溶液に、室温で炭酸水素ナトリウム (10.8 g, 129 mmol) を加え、室温で 15 分撹拌した。続いて、室温で 2,5-ジオキソピロリジン-1-イル 9H-フルオレン-9-イルメチル カルボネート (21.7 g, 64.3 mmol) の 1,4-ジオキサン (60 mL) 溶液を加え、室温で 14 時間撹拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで 3 回抽出し、合わせた有機層を水及び飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し

ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣にジエチルエーテル及びヘプタンを加え、析出した固体をろ取し、標記化合物（22.3 g、収率：定量的）を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.00-2.15(1H, m), 3.81(3H, s), 3.89-4.07(2H, m), 4.20-4.28(1H, m), 4.39-4.53(3H, m), 5.63-5.74(1H, m), 7.29-7.37(2H, m), 7.38-7.46(2H, m), 7.55-7.65(2H, m), 7.74-7.82(2H, m).

[0051] [製造例 1-2-2] メチル (2S)-2-(((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ)-3-(((4-メチルベンゼン)スルホニル)オキシ)プロパノエート

[化11]

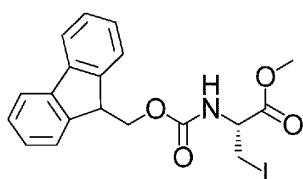


製造例 1-2-1 に記載のメチル (2S)-2-(((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヒドロキシプロパノエート (5.00 g、14.6 mmol) とピリジン (25 mL) の混合溶液に、0℃で4-ジメチルアミノピリジン (18.0 mg、0.146 mmol)、p-トルエンスルホニル クロリド (5.58 g、29.3 mmol) を加え、0℃で7時間攪拌した。反応混合物に水を加え、酢酸エチルで2回抽出した。合わせた有機層を1 N塩酸で3回、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、および飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣に酢酸エチル、ジエチルエーテルおよびヘプタンを加え、析出した固体をろ取し、標記化合物 (6.20 g、収率：85%) を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 2.37(3H, s), 3.74(3H, s), 4.

16-4.23(1H, m), 4.23-4.31(1H, m), 4.32-4.40(2H, m), 4.41-4.48(1H, m),
4.54-4.62(1H, m), 5.63-5.66(1H, m), 7.26-7.37(4H, m), 7.38-7.45(2H, m),
7.56-7.64(2H, m), 7.72-7.81(4H, m).

[0052] [製造例 1-2-3] メチル (2R)-2-((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ-3-ヨードプロパノエート
[化12]

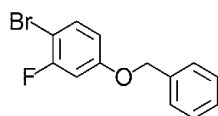


製造例 1-2-2 に記載のメチル (2S)-2-((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ-3-((4-メチルベンゼン)スルホニル)オキシ)プロパノエート (6.20 g, 12.5 mmol) とアセトン (50 mL) の混合溶液に、室温でヨウ化ナトリウム (9.38 g, 62.6 mmol) を加え、室温で90時間50分攪拌した。反応混合物をろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液、および飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣にジエチルエーテルおよびヘプタンを加え、析出した固体をろ取し、標記化合物 (3.82 g、収率：68%) を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.55-3.66(2H, m), 3.84(3H, s), 4.20-4.30(1H, m), 4.35-4.48(2H, m), 4.56-4.62(1H, m), 5.63-5.72(1H, m), 7.30-7.37(2H, m), 7.38-7.45(2H, m), 7.62(2H, d, J=7.2 Hz), 7.78(2H, d, J=7.5 Hz).

[0053] [製造例 1-2-4] 4-(ベンジルオキシ)-1-ブロモ-2-フルオロベンゼン

[化13]

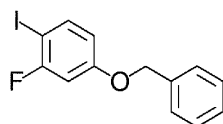


市販の4-ブロモ-3-フルオロフェノール（15.0 g、78.5 mmol）とDMF（30 mL）の混合溶液に、室温で炭酸カリウム（21.7 g、157 mmol）、ベンジルブロミド（10.2 mL、86.4 mmol）を加え、室温で20分撹拌した後に、70℃で40分撹拌した。反応混合物を室温に冷却した後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘプタン：酢酸エチル＝5：1）で精製し、標記化合物（22.7 g、収率：定量的）を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.04(2H, s), 6.65-6.72(1H, m), 6.75-6.80(1H, m), 7.30-7.45(6H, m).

[0054] [製造例1-2-5] 4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロ-1-ヨードベンゼン

[化14]



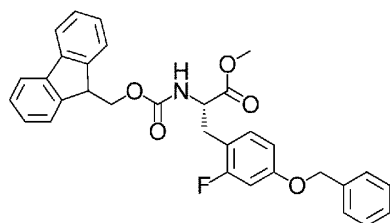
製造例1-2-4に記載の4-(ベンジルオキシ)-1-ブロモ-2-フルオロベンゼン（187 g、665 mmol）と1,4-ジオキサン（300 mL）の混合溶液に、室温でヨウ化銅（I）（12.6 g、66.1 mmol）、ヨウ化ナトリウム（200 g、1.33 mol）、N,N'-ジメチルエチレンジアミン（14.0 mL、132 mmol）を加え、窒素雰囲気下、110～115℃にて19時間撹拌した。反応混合物を室温に冷却した後、水と酢酸エチルを加え、セライトを用いてろ過し、ろ液を分配した。得られた水層を酢酸エチルで抽出した。得られた有機層を合わせ、シリカゲル

ルを敷いたガラスフィルターでろ過した。シリカゲルを酢酸エチルで洗浄し、得られた有機層を合わせ、溶媒を減圧下留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘプタン：酢酸エチル＝7：1ついで4：1）で精製し、標記化合物（195g、収率：89％）を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 5.04(2H, s), 6.57-6.62(1H, m), 6.73(1H, dd, J=2.8Hz, 10.0 Hz), 7.31-7.43(5H, m), 7.55-7.60(1H, m).

[0055] [製造例1-2-6] メチル (2S)-3-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-2-((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ)プロパノエート

[化15]



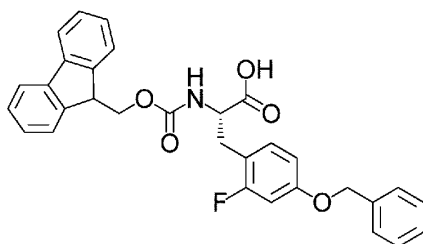
亜鉛粉末（51.6g、789mmol）を1N塩酸（100mL）に加え、超音波振動にかけた後、静止させ上澄み液を除いた。この操作を2回行った。得られた亜鉛の残渣に水（300mL）を加え、攪拌した後、静止させ上澄み液を除く操作を3回行った。更にアセトン（300mL）を加え、攪拌した後、静止させ上澄み液を除き、続いてジエチルエーテル（300mL）を加え、攪拌した後、静止させ上澄み液を除き、残渣を減圧下乾燥させ、活性化亜鉛を得た。この活性化亜鉛に、窒素雰囲気下、室温でDMF（120mL）、ヨウ素（3.36g、13.2mmol）を加え、室温で45分攪拌した。反応混合物に、窒素雰囲気下、室温で製造例1-2-3に記載のメチル (2R)-2-((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ)-3-ヨードプロパノエート（120g、266mmol）のDMF（500mL）溶液を30分かけて加え、室温で40分間攪拌した。窒素雰囲気下、室温で反応混合物に、製造例1-2-5に記載の4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロ-1-ヨードベンゼン（104g、31

8 mmol)、トリス(ジベンジリデンアセトン)パラジウム(0)(6.00 g、6.55 mmol)、2-ジシクロヘキシルホスフィノー2', 6'-ジメトキシビフェニル(5.40 g、13.2 mmol)を加え、室温で20時間40分撹拌した。反応混合物に水と酢酸エチルを加え、セライトを用いてろ過した。ろ液を分配し、更に水層を酢酸エチルで3回抽出した。合わせた有機層を水および飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣にジエチルエーテル(1.00 L)、ヘプタン(1.00 L)を加え、析出した固体をろ取した。ろ取した固体にジエチルエーテル(500 mL)、ヘプタン(500 mL)を加え、析出した固体をろ取し、標記化合物(107 g、収率: 77%)を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.03-3.20(2H, m), 3.75(3H, s), 4.20(1H, t, J=6.6 Hz), 4.25-4.38(1H, m), 4.43(1H, dd, J=7.1 Hz, 10.4 Hz), 4.58-4.70(1H, m), 4.99(2H, s), 5.33(1H, d, J=8.4 Hz), 6.63-6.72(2H, m), 6.94-7.03(1H, m), 7.26-7.48(9H, m), 7.52-7.62(2H, m), 7.77(2H, d, J=7.7 Hz).

[0056] [製造例1-2-7] (2S)-3-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-2-((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ)プロパノイックアシッド

[化16]



製造例1-2-6に記載のメチル (2S)-3-(4-(ベンジルオキシ)-2-フルオロフェニル)-2-((9H-フルオレン-9-イルメトキシ)カルボニル)アミノ)プロパノエート(60.0 g、114 mmol)

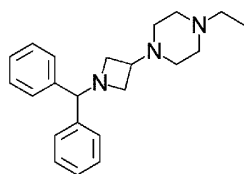
1) と酢酸エチル (1331 mL) の混合溶液に、室温でヨウ化リチウム (92.0 g、685 mmol) を加え、加熱還流下23時間45分撈拌した。反応混合物を0℃に冷却し、析出した固体をろ取した。得られた固体に1N塩酸 (228 mL) を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、標記化合物 (42.2 g、収率：72%) を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 3.05-3.15(1H, m), 3.18-3.30(1H, m), 4.15-4.23(1H, m), 4.25-4.50(2H, m), 4.60-4.70(1H, m), 4.99(2H, m), 5.29(1H, d, J=7.6 Hz), 6.64-6.73(2H, m), 7.06(1H, dd, J=8.0, 9.6 Hz), 7.24-7.44(9H, m), 7.55(2H, dd, J=6.4, 6.4 Hz), 7.76(2H, d, J=7.6 Hz).

ESI-MS(m/z): 512.30 [M+H]⁺.

[0057] [製造例1-3-1] 1-(1-(ジフェニルメチル)アゼチジン-3-イル)-4-エチルピペラジン

[化17]



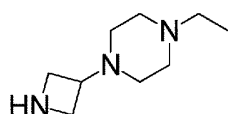
市販の1-(ジフェニルメチル)アゼチジン-3-オン (10.1 g、42.6 mmol) とTHF (100 mL)、酢酸 (5.00 mL) の混合溶液に、室温でエチルピペラジン (6.48 mL、51.1 mmol) を加え、室温で45分間撈拌した。反応混合物に、室温でトリアセトキシ水素化ホウ素ナトリウム (18.1 g、85.1 mmol) を加え、室温で15時間撈拌した。反応混合物に炭酸水素ナトリウム、水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥し、ろ過した。溶媒を減圧下留去し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル～メタノール) で精製した後、NHシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘプタン：酢酸エチル=2：1ついで1：1) で精製し

、標記化合物（12.7 g、収率：89%）を得た。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.07(3H, t, J=7.6 Hz), 2.20-2.65(10H, m), 2.85-2.93(2H, m), 2.95-3.05(1H, m), 3.35-3.45(2H, m), 4.41(1H, s), 7.15-7.20(2H, m), 7.23-7.29(4H, m), 7.37-7.42(4H, m).

[0058] [製造例 1-3-2] 1-(アゼチジン-3-イル)-4-エチルピペラジン

[化18]



製造例 1-3-1 に記載の 1-(1-(ジフェニルメチル)アゼチジン-3-イル)-4-エチルピペラジン（12.7 g、37.9 mmol）とメタノール（50 mL）の混合溶液に、室温で水酸化パラジウム-炭素（5.00 g）を加え、水素雰囲気下、室温、0.35 MPa~0.40 MPa で 10 時間撹拌した。反応混合物を窒素雰囲気中に置換した後、セライトを用いてろ過した。ろ液を減圧下濃縮し、標記化合物をベンジルベンゼンとの混合物（12.4 g）として得た。これ以上精製することなく、次の反応に用いた。

¹H-NMR Spectrum (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 1.09(3H, t, J=7.2 Hz), 2.10-2.80(10H, m), 3.20-3.30(1H, m), 3.53-3.60(2H, m), 3.60-3.70(2H, m).

[0059] [実施例 2]

(6S, 9aS)-N-ベンジル-8-({6-[3-(4-エチルピペラジン-1-イル)アゼチジン-1-イル]ピリジン-2-イル}メチル)-6-(2-フルオロ-4-ヒドロキシベンジル)-4,7-ジオキソ-2-(プロプ-2-エン-1-イル)ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ[2,1-c][1,2,4]トリアジン-1(6H)-カルボキサミドの結晶

実施例 1 に記載の (6S, 9aS)-N-ベンジル-8-({6-[3-(4-エチルピペラジン-1-イル)アゼチジン-1-イル]ピリジン-2-イル}メチル)-6-(2-フルオロ-4-ヒドロキシベンジル)-4,

7-ジオキソ-2-(プロペ-2-エン-1-イル)ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ[2,1-c][1,2,4]トリアジン-1(6H)-カルボキサミド(150mg)に酢酸イソプロピル(1.5mL)を加え85℃で1時間、さらに室温で終夜攪拌した。得られた懸濁物を濾取し、4℃に冷却した酢酸イソプロピルで洗浄した後、45℃で減圧乾燥し、白色固体を141.2mg得た。得られた固体のうち100mgに1-プロパノール(0.4mL)を加え95℃で加熱溶解した。1-プロパノール(0.1mL)を追加し、室温で攪拌した。得られた懸濁物にヘプタン(1.5mL)を室温で加えた。懸濁物を濾取し、4℃に冷却したヘプタンで洗浄した後、45℃で減圧乾燥し、標記化合物を92.1mg得た。

¹H-NMR(600 MHz, CD₃OD) δ (ppm): 1.15 (t, J=7 Hz, 3 H), 2.0-3.1 (br, 8 H), 3.13 (dd, J=14, 7 Hz, 1 H), 3.32 (m, 1 H), 3.33 (m, 1 H), 3.44 (dd, J=14, 5 Hz, 1 H), 3.46 (d, J=17 Hz, 1 H), 3.54 (dd, J=12, 4 Hz, 1 H), 3.62 (dd, J=13, 6 Hz, 1 H), 3.69 (dd, J=13, 7 Hz, 1 H), 3.79 (dd, J=8, 5 Hz, 1 H), 3.86 (dd, J=8, 6 Hz, 1 H), 3.89 (t, J=11 Hz, 1 H), 4.03 (t, J=8 Hz, 1 H), 4.06 (t, J=8 Hz, 1 H), 4.25 (d, J=15 Hz, 1 H), 4.33 (d, J=16 Hz, 1 H), 4.41 (d, J=16 Hz, 1 H), 4.77 (d, J=16 Hz, 1 H), 5.12 - 5.18 (m, 2H), 5.27 (dd, J=7, 5 Hz, 1 H), 5.84 (m, 2H), 6.30 (d, J=8 Hz, 1 H), 6.38 (m, 1 H), 6.40 (m, 1 H), 6.51 (d, J=8 Hz, 1 H), 6.88 (dd, J=9, 8 Hz, 1 H), 7.25 (dd, J=8, 7 Hz, 1 H), 7.28 (d, J=8 Hz, 2 H), 7.34 (dd, J=8, 7 Hz, 2 H), 7.47 (dd, J=8, 8 Hz, 1 H)

[0060] 試験例1：Wntシグナルの検出

p cDNA3.1 (+) (i n v i t r o g e n) を、制限酵素B g l I I およびN o t I を用いて切断し、以下に示す配列を有するアダプターBEHKS (制限酵素サイトB g l I I I、E c o R I、H i n d I I I、K p n I、S a c I およびN o t I を含む) を挿入することにより、プラスミドpNe o-HKSを作製した。

BEHKS-F 5' - g a t c t g a a t t c a a g c t t c t c g a

g g g t a c c t c t a g a g a g c t c g c - 3' (配列番号1)

BEHKS-R 5' - g g c c g c g a g c t c t c t a g a g g t a
c c c t c g a g a a g c t t g a a t t c a - 3' (配列番号2)

次に、TOPgloTM/FOPgloTM TCF Reporter Kit (upstate Catalog #17-366) に含まれるTOPgloTMプラスミドから、制限酵素HindIIIおよびKpnIを用いて切断した約2700bpフラグメント(Wnt応答性配列およびルシフェラーゼ遺伝子を含む)を、pNeo-HKSのHindIII-KpnI間へ挿入してプラスミドpNeo-TOPを作製した。ヒト胎児由来腎臓細胞株HEK293にプラスミドpNeo-TOPを導入し、G418を用いて化合物を選択した後、限界希釈法により細胞クローン株を樹立した。本細胞クローン株をWntシグナル検出試験に供した。

本細胞クローン株は、10%FBSを含むD-MEM 高グルコース培地(和光純薬工業(株)製)で継代培養し、試験には増殖期の細胞を使用した。トリプシン-EDTAを用いて細胞を回収後、細胞数を計測して 2×10^5 個/mLになるように10%FBSを含むD-MEM 高グルコース培地に懸濁した。その細胞懸濁液を細胞培養用96ウェルプレート(グライナー社製、製品番号655083)に0.1mL/well加え、5%CO₂インキュベーター中(37℃)で一晩培養した。培養後、DMSOで溶解した被検物質を10%FBSおよび80mM LiClを含むD-MEM 高グルコース培地で希釈して被検溶液を得た。上記被検溶液0.1mLを各ウェルに添加し、5%CO₂インキュベーター中(37℃)で培養した。被検溶液添加してから6時間後に各ウェルの上清を取り除き、50μLのBright-GloTM Luciferase基質(Promega社製、製品番号E2620)を添加した。そのプレートをプレートミキサーに数秒かけた後に、EnVisionTM Multilabelプレートリーダー(パーキンエルマー社製)を用いて各ウェルの発光を測定した。被検溶液を添加せず、LiClを添加したウェルの発光度を100%のWntシグナル活性として、

また、被検物質およびLiClのどちらも添加していないウェルの発光度を0%のWntシグナル活性として、各ウェルのWntシグナル活性率(%)を求め、被検物質のWntシグナル活性を50%阻害するのに必要な濃度(IC₅₀)を算出した。実施例1化合物のIC₅₀は、0.06 μMであった。

[0061] 試験例2：APC^{Min/+}マウスの小腸ポリープ抑制作用

Wntシグナルの分解制御因子であるAPC遺伝子(Adenomatous polyposis coli gene)は大腸癌抑制遺伝子と呼ばれ、ヒト家族性大腸腺腫症の原因遺伝子にもなっている。APC遺伝子に変異が生じると、大腸粘膜細胞は無秩序な異常増殖を開始し、前癌病変とも言うべき大腸ポリープを形成する。このように大腸癌発生プロセスの初期段階において重要な役割を担っていることが知られている。

このAPC遺伝子の突然変異マウス(APC^{Min/+}マウス)は、家族性大腸腺腫症患者と同様に腸管に多くのポリープを発症し、WNTシグナルに基づく大腸がんの発癌や浸潤のメカニズムの解明に有用であり、大腸癌の予防、診断、治療の研究に使われているスタンダードモデルとなっている。APC^{Min/+}マウス(C57BL/6J-APC<Min>/J Hetero、雌、株式会社サンプラネットにて生産)の群分けは、投与初日の当該マウスの体重の平均値がほぼ等しくなるようにして、行った。被験物質(実施例1化合物)を0.1 N HClで投与濃度となるように溶解し、4℃の冷蔵庫内で保管して、評価検体を得た。コントロール(Vehicle)群には、投与用溶媒のみを評価検体として用いた。評価検体は50 mg/kgおよび75 mg/kgの投与容量で1日2回4日連続して経口投与した後、3日間の休薬期間を設けることを1サイクルとし、計16日間(4日間×4サイクル)投与した。なお、実験は1群6-7匹のマウスを用いて行った。コントロール群、被験物質投与群それぞれに対し、初日の体重に対する最終日の体重の値(relative body weight: RBW)を算出した。被験物質投与群のRBW/コントロール群のRBWが0.8以上の被験物質投与群を安全に投与可能な群と判定した。これに該当する被験物質投与群

について、最終日（投与初日から25日目）におけるコントロールのポリープ数に対する被験物質投与後のポリープ数の実数および標準誤差を図1に示した。なお、ポリープは小腸と結腸に形成したものをカウントした。コントロール群に対する被験物質投与群の統計解析（Dunnett's test）を行い、P値を記載した。

[0062] 試験例3：ヒトK562皮下移植モデルにおける抗腫瘍効果

10%FBS、ペニシリン／ストレプトマイシンを含むRPMI-1640培養液で培養したヒト慢性骨髄性白血病細胞株K562をPBS（和光純薬工業株式会社 Cat # 045-29795）にて 2×10^8 cells/mL濃度に調製したものと、MATRIGEL（BDバイオサイエンス Cat # 354234）とを1：1で混合し、 1×10^8 cells/mLの細胞懸濁液を調製した。得られた細胞懸濁液を、6週齢のヌードマウス（CAnN, Cg-Foxn1nu/Cr1Cr1j、雌、日本チャールス・リバー株式会社）の右脇腹皮下部に100 μ Lの用量で移植した。移植から7日後に電子デジタルノギス（デジマチックTMキャリパ、株式会社ミツトヨ）を用いて腫瘍の短径、長径を計測し、以下の計算式で腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{長径 (mm)} \times \text{短径 (mm)} \times \text{短径 (mm)} / 2$$

ヌードマウスの群分けは、投与初日の腫瘍体積をもとに腫瘍体積の平均値がほぼ等しくなるようにして、行った。被験物質（実施例1化合物）を0.1N HClに溶解し、10 mL/kgの投与用量となるように調製し、評価検体を得た。また、Dasatinib, Free Base（LC Laboratories, Cat. No. D-3307）を、10 mL/kgの投与用量となるように、大塚蒸留水（大塚製薬株式会社、Cat # 1324）とPROPYLENE GLYCOL（和光純薬工業株式会社、Cat # 164-04996）の1：1溶液に溶解し、Dasatinib投与液を調製した。評価検体は1日2回（bid）で投与初日より5日間連続して経口投与を行った。Dasatinib投与液は1日1回（qd）5日

間連続して経口投与した後、2日間の休薬期間を設けることを1サイクルとし、合計2サイクル投与した。コントロール群は無投与とした。なお、実験は1群9-10匹のマウスを用いて行った。コントロール群、被験物質単独投与群、Dasatinib単独投与群、ならびに、被験物質およびDasatinib併用投与群（以下、「併用投与群」ともいう。）それぞれに対し、初日から28日目まで経時的に腫瘍体積および、体重を測定した。コントロール群、被験物質単独投与群は、投与初日から11日目まで測定した。測定毎に0日目の腫瘍体積に対する腫瘍体積の値（relative tumor volume: RTV）および、体重の値（relative body weight: RBW）を算出し、投与初日から28日目までのグラフを図2、図3にそれぞれ示した。また、28日目のRTV値を使用し、Dasatinib単独投与群に対する併用投与群の統計解析（Dunnett's test）を行い、P値が0.05以下であった群にアスタリスク（*）を付けた。さらに、28日目に腫瘍が目視および触知できない（non-palpable tumor）個体数を表1に示した。その時、Dasatinib単独投与群に対する被験物質Dasatinib併用投与群の統計解析（Fisher's test）を行い、P値が0.05以下に関して*を、P値0.01以下の群には***を付けた。

[0063] [表1]

投与された化合物	腫瘍が目視および触知できない個体数 ／投与された個体数
Vehicle	0/10
Dasatinib 5 mg/kg	0/9
Dasatinib 5 mg/kg + 実施例 1 化合物 35 mg/kg	6/10*
Dasatinib 5 mg/kg + 実施例 1 化合物 50 mg/kg	9/10***
Dasatinib 5 mg/kg + 実施例 1 化合物 75 mg/kg	10/10***

[0064] 試験例 4：粉末X線回折

実施例2で得られた化合物1の結晶を、粉末X線回折装置の試料台に載せ、下記の条件で分析した。その結果を図4に示す。

(測定条件)

ターゲット：銅

検出器：シンチレーションカウンター

管電圧：50 kV

管電流：300 mA

スリット：発散スリット0.5 mm、散乱スリット開放、受光スリット開放

スキャン速度：5° / min

サンプリング間隔：0.02°

スキャン範囲：5° ~ 35°

サンプルホルダー：アルミニウム製ホルダー

[0065] 試験例5：熱分析

実施例2で得られた結晶をアルミニウム製試料パンに精密に秤取し、以下の条件で熱重量分析(TG)及び示差熱分析(DTA)を行った。その結果を図5に示す。

(測定条件)

雰囲気：40 mL / min 窒素ガス気流下

対照：空のアルミニウム製試料パン

昇温速度：10°C / min

サンプリング間隔：1 sec

測定温度範囲：40 ~ 300°C

[0066] 試験例6：¹³C固体NMRスペクトル

¹³C固体NMRスペクトルは以下の条件で測定した。結果を図6に示す。

(測定条件)

使用装置：Advance 400 MHz (BRUKER社製) 7 mm - CPM

ASプローブ (BRUKER社製)

測定核：¹³C (共鳴周波数 100.6248425 MHz)

測定温度：室温（22℃）

パルスモード：CPTOSS測定

回転数：5000Hz

パルス繰り返し時間：4sec

コンタクトタイム：1msec

積算回数：8000回

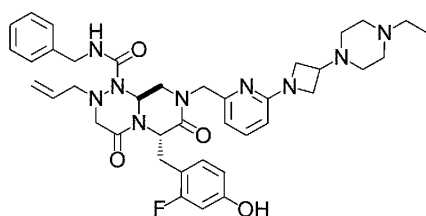
基準物質：グリシン（外部基準：176.03ppm）

[0067] ^{13}C 固体NMRスペクトルは、BRUKER社製7mm-CPMASプローブを装着したAdvance400MHz（BRUKER社製）を用いて、炭素核（共鳴周波数100.6MHz）のCPTOSS法（スピニングサイドバンド消去法）により得られた。およそ300mgの固体試料を内封した試料管を5kHzで回転させ、コンタクトタイム1msec、パルス待ち時間4sec、積算回数8000回、室温（22℃）で測定された。化学シフトはグリシンのカルボニル炭素を176.03ppmとする外部基準法で補正された。

請求の範囲

〔請求項1〕 (6S, 9aS) -N-ベンジル-8- ({6- [3- (4-エチルピペラジン-1-イル) アゼチジン-1-イル] ピリジン-2-イル} メチル) -6- (2-フルオロ-4-ヒドロキシベンジル) -4, 7-ジオキソ-2- (プロプ-2-エン-1-イル) ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ [2, 1-c] [1, 2, 4] トリアジン-1 (6H) -カルボキサミドの結晶。

〔化1〕



〔請求項2〕 粉末X線回折において、回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 5.8° に回折ピークを有する、請求項1に記載の結晶。

〔請求項3〕 粉末X線回折において、回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 5.8° 、 6.4° および 10.1° に回折ピークを有する、請求項1に記載の結晶。

〔請求項4〕 粉末X線回折において、さらに回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 8.0° および 12.8° に回折ピークを有する、請求項3記載の結晶。

〔請求項5〕 粉末X線回折において、さらに回折角度 ($2\theta \pm 0.2^\circ$) 14.2° 、 16.0° 、 18.9° 、 19.7° および 23.1° に回折ピークを有する、請求項4に記載の結晶。

〔請求項6〕 ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 154.7 ppm にピークを有する、(6S, 9aS) -N-ベンジル-8- ({6- [3- (4-エチルピペラジン-1-イル) アゼチジン-1-イル] ピリジン-2-イル} メチル) -6- (2-フルオロ-4-ヒドロキシベンジル) -4, 7-ジオキソ-2- (プロプ-2-エン-1-イル) ヘキサヒドロ-2H-ピラジノ [2, 1

－c] [1, 2, 4] トリアジン－1 (6H) －カルボキサミドの結晶。

[請求項7] ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、さらに化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 141.1 ppmおよび158.1 ppmにピークを有する、請求項6記載の結晶。

[請求項8] ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、さらに化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 134.0 ppmおよび165.1 ppmにピークを有する、請求項7記載の結晶。

[請求項9] ^{13}C 固体NMRスペクトルにおいて、さらに化学シフト ($\delta \pm 0.5 \text{ ppm}$) 12.6 ppm、55.5 ppmおよび118.5 ppmにピークを有する、請求項8記載の結晶。

[請求項10] 図4で示される粉末X線パターンと実質的に同一の粉末X線回折パターンを有する、(6S, 9aS)－N－ベンジル－8－({6－[3－(4－エチルピペラジン－1－イル) アゼチジン－1－イル] ピリジン－2－イル} メチル)－6－(2－フルオロ－4－ヒドロキシベンジル)－4, 7－ジオキソ－2－(プロプ－2－エン－1－イル) ヘキサヒドロ－2H－ピラジノ [2, 1－c] [1, 2, 4] トリアジン－1 (6H) －カルボキサミドの結晶。

[請求項11] 図6で示される ^{13}C 固体NMRスペクトルと実質的に同一の ^{13}C 固体NMRスペクトルを有する、(6S, 9aS)－N－ベンジル－8－({6－[3－(4－エチルピペラジン－1－イル) アゼチジン－1－イル] ピリジン－2－イル} メチル)－6－(2－フルオロ－4－ヒドロキシベンジル)－4, 7－ジオキソ－2－(プロプ－2－エン－1－イル) ヘキサヒドロ－2H－ピラジノ [2, 1－c] [1, 2, 4] トリアジン－1 (6H) －カルボキサミドの結晶。

[請求項12] 請求項1～11のいずれか一項に記載の結晶を含む、医薬組成物。