

氏 名（本籍）	石本 和久（福井県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 41 号
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 10 日
学位授与の条件	学位規程第 4 条第 2 項該当者
学位論文の題名	含窒素 5,6-縮合複素環を母核とした VEGFR-2 キナーゼ 阻害薬のプロセス研究
論文審査委員	主 査 教 授 宮田 興子 副 査 教 授 棚橋 孝雄 副 査 教 授 小林 典裕 副 査 教 授 和田 昭盛

論文内容の要旨

（緒言）

創薬化学の研究でいかに優れた薬効を持つ化合物が見出されたとしても、価格が高く、高品質なものを安定的に供給することができなければ、医薬品として上市することは難しい。プロセス化学は創薬化学で見出された医薬品候補化合物について、効率的、かつ堅牢で環境調和型の大量合成法を開発することにより、高品質な薬をより早く、安価かつ安定的に患者に届けるという非常に重要な役割を担っている。化合物 **1**、**2**、および **3** は、VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor-2) キナーゼ阻害薬¹ 候補化合物として創製され、抗癌剤としての開発が進められてきた化合物である (Figure 1)。² これらの化合物の初期の開発をサポートするために、数百グラムから数キログラムの原薬合成が求められたが、大量合成を行う上で、有機合成化学の観点から、また実製造の観点から解決すべき課題が数多く存在していた。筆者はこれらの課題を解決すべく、プロセス化学の見地から詳細な検討を行い、簡便かつ大量合成に適した製造法を開発した。³ これらの研究結果について以下に詳述する。

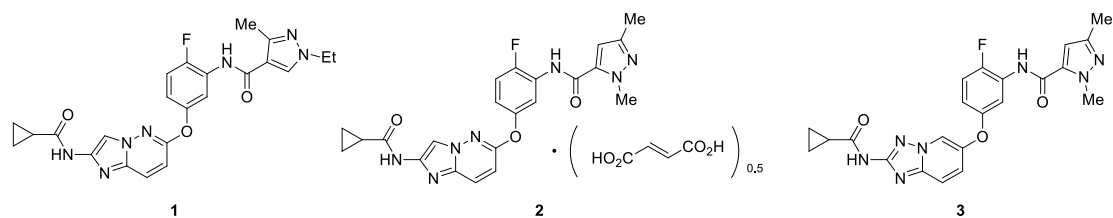
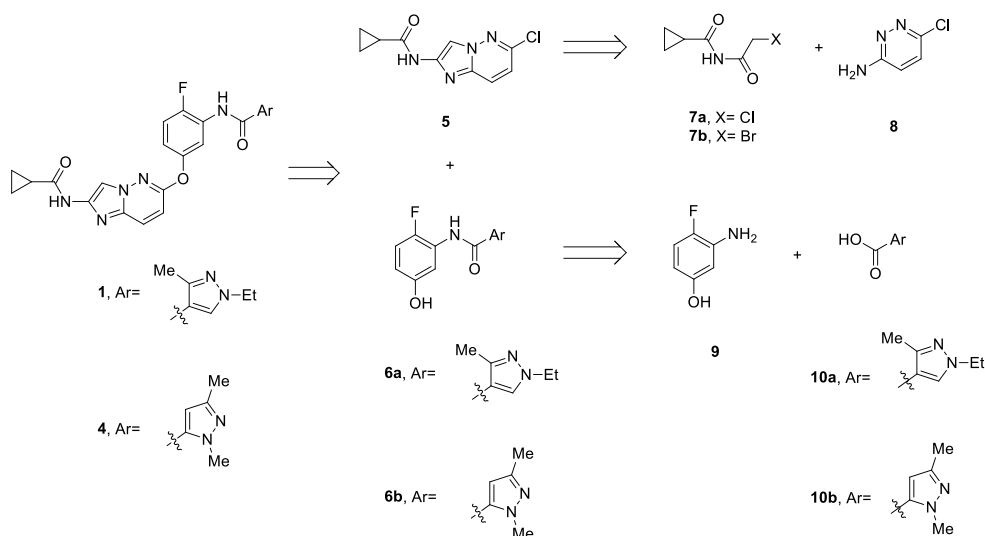


Figure 1. VEGFR-2 キナーゼ阻害薬候補化合物

第1章 イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン-2-アミン骨格を有する VEGFR-2 キナーゼ阻害薬開発におけるプロセス化学研究

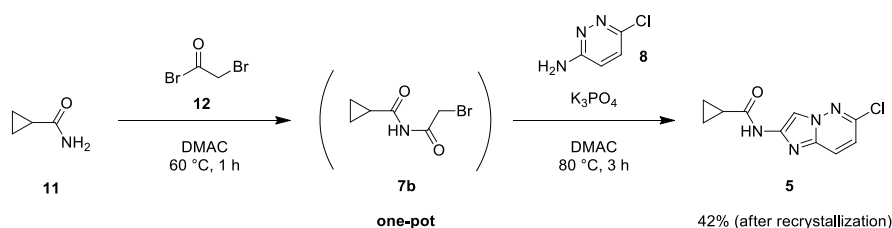
創薬化学における化合物 **1** および **2** の合成法は、リニアな合成法で総収率が 20%程度に止まる上、(1) 非常に高価かつ入手が難しい 3-アミノ-6-ヨードピリダジンを原料として使用している、(2) カラム

クロマトグラフィーによる化合物の精製を行っている、(3) アミノフェノール **9** とヨードイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジンの S_NAr 反応において高温 (150 °C) が必要となる、(4) 大量に入手することのできないピラゾール **10a** を使用している、(5) 化合物 **4** の 0.5 フマル酸塩形成の再現性が乏しい、といった問題点を有していた。筆者は以上の問題点を踏まえ、大量合成を指向したコンバージェントな製造法の開発を行うこととした (Scheme 1)。化合物 **5** は、安価な 3-アミノ-6-クロロピリダジン **8** をシクロプロピル基を導入したイミド **7a/7b** と反応させることで、保護基を用いることなく合成できると考えた。フェノール **6a/6b** については、3-アミノ-4-フルオロフェノール **9** とピラゾールカルボン酸 **10a/10b** を縮合させて合成する手法を選択した。大量入手の難しいピラゾール **10a** については、安価なケトエステルからの効率的合成法を開発することにより、その供給法の改善を試みた。



Scheme 1. 化合物 **1** と **4** の逆合成解析

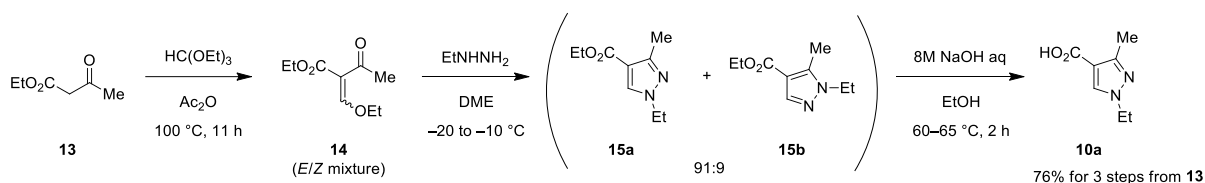
最初に、イミダゾピリダジン **5** の合成に着手した。市販のシクロプロパンカルボキサミド **11** を、*N,N*-ジメチルアセトアミド (DMAC) 中で **12** と反応させ、得られたイミド **7b** を単離することなく、 K_3PO_4 存在下にアミノピリダジン **8** とワンポットで反応させたところ、目的のクロロイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン **5** が得られることを見出した。これはイミドと 3-アミノピリダジン誘導体を縮合して、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン-2-アミン骨格を合成した最初の例となる (Scheme 2)。



Scheme 2. イミダゾピリダジン **5** の合成

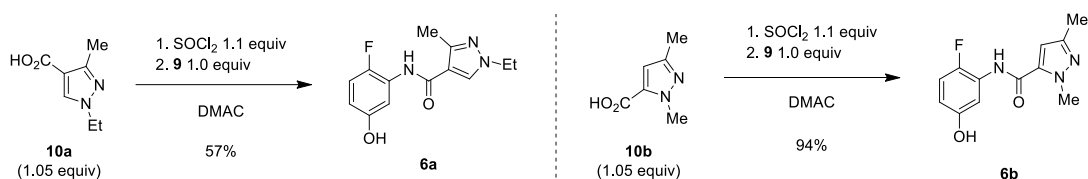
次に、ピラゾール環を有するフェノール **6** の合成を検討した。安価なケトエステル **13** から容易に合成できる 2-(エトキシメチレン)ケトエステル **14** とエチルヒドラジンとの反応を、種々の溶媒中で検討した結果、溶媒として 1,2-ジメトキシエタン (DME) を用いると、目的の置換様式を持ったピラゾール **15a** が、高い選択性 (**15a** : **15b** = 91 : 9) で生成することを見出した。加水分解を行った後、pH を調整して晶

析を行うと、目的の **10a** がカラムクロマトグラフィーでの精製を行うことなく、純度よく高収率に得られた (Scheme 3)。



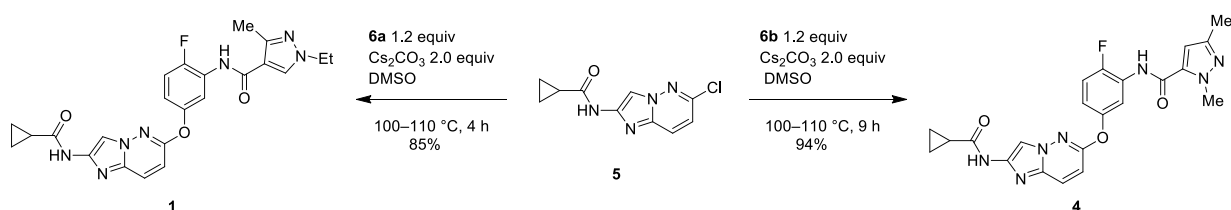
Scheme 3. ピラゾールカルボン酸 **10a** の合成

次に、**13** から調製したピラゾールカルボン酸 **10a** と市販のカルボン酸 **10b** を、それぞれ酸クロリドに変換した後、アミノフェノール **9** と反応させると目的のフェノール **6a/6b** を合成することができた (Scheme 4)。



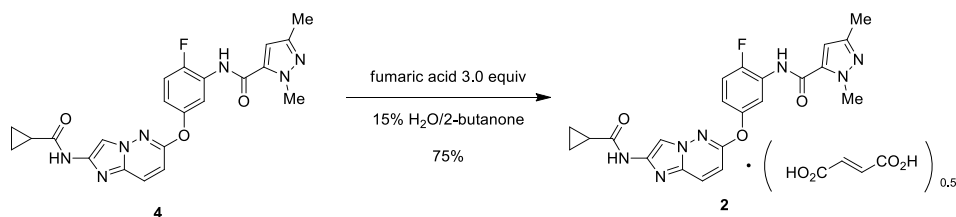
Scheme 4. フェノール **6a/6b** の合成

続いて、イミダゾピリダジン **5** と **6a/6b** とのカップリング反応を検討した。クロロイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン **5** とフェノール **6a/6b** の S_NAr 反応について、塩基と溶媒のスクリーニングを行った結果、DMSO/Cs₂CO₃ の組み合わせで反応速度が向上し、100–110 °C で反応が効率的に進行することを明らかにした。反応終了後に、反応液に MeOH と水を添加するのみで晶析が起こり、結晶を濾取すると容易に目的の **1** と **4** を単離することができた (Scheme 5)。



Scheme 5. **1** と **4** の合成

化合物 **4** の 0.5 フマル酸塩への変換については、再現性を高めるために各種の塩化条件の検討を行った。最終的に、10–15%含水 2-butanone を溶媒として用いることで **4** の溶解度が大きく向上すること、さらに、フマル酸の使用量を 3.0 当量まで増量することで安定的に塩形成が起こることを見出した (Scheme 6)。

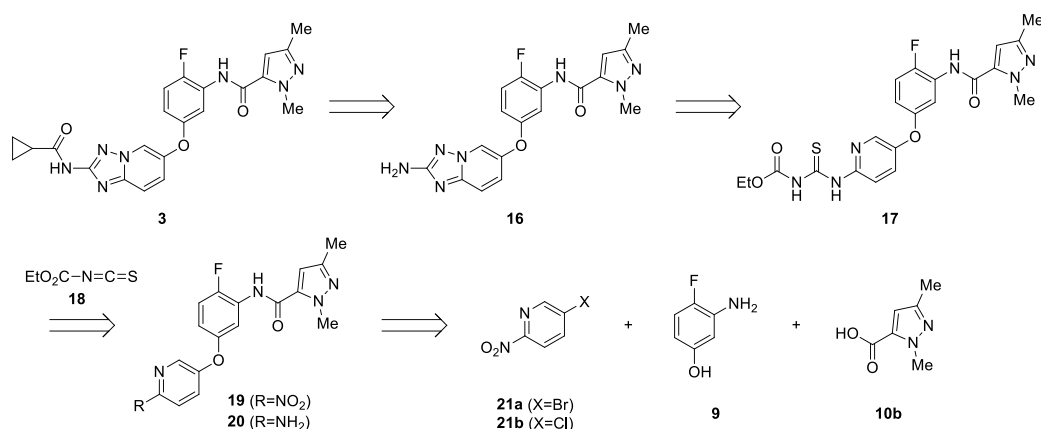


Scheme 6. **2** の合成

以上の検討の結果、コンバージェントで簡便、かつ堅牢性の高い VEGFR-2 キナーゼ阻害薬の候補化合物 **1** と **2** の合成法を開発することに成功した。

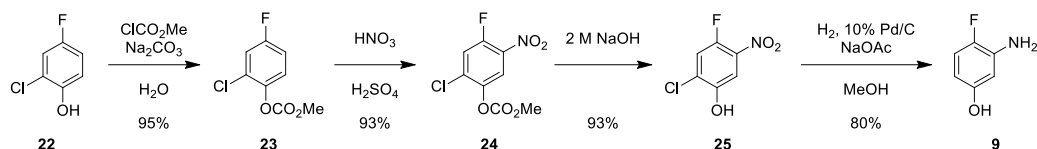
第2章 [1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン骨格を有する VEGFR-2 キナーゼ阻害薬開発におけるプロセス化学研究

創薬化学における化合物 **3** の合成法は、キログラムスケールのバルク製造を行う上で、(1) リニアな合成法であり、総収率が低い、(2) アミノフェノール **9** の大量入手が難しい、(3) **19** の合成における S_NAr 反応が効率的に進行しないため、反応後、**19** をカラムクロマトグラフィーで精製する必要がある、(4) 高価、かつ催涙性のあるイソチオシアネート **18** を使用している、といった問題点を有していた。筆者は Scheme 7 に示した逆合成に従い、これらの問題点を解決した、簡便で実用的な大量合成法を開発するためにプロセス化学研究を行った。アミノフェノール **9** の合成については、収率の低い接触還元の詳細な検討を行い、収率低下のメカニズムを明らかにするとともに、収率向上の方策を採ることとした。なお、化合物 **9** は第 1 章の化合物 **1**、**2** の合成の際にも用いているが、**3** の合成においてより主要な出発物質となっているため、合成法の改良は **3** の合成時に行った。さらに、**19** の効率的合成を目指して、3 種の化合物 **21**、**9**、**10b** の連結順序も検討した。より優れた組み合わせを製造法として採用することで、カラムクロマトグラフィーによる精製の回避を目指した。また、イソチオシアネート **18** については、安価な原料から *in situ* で調製し、そのまま単離することなくワンポットで使用することを検討した。



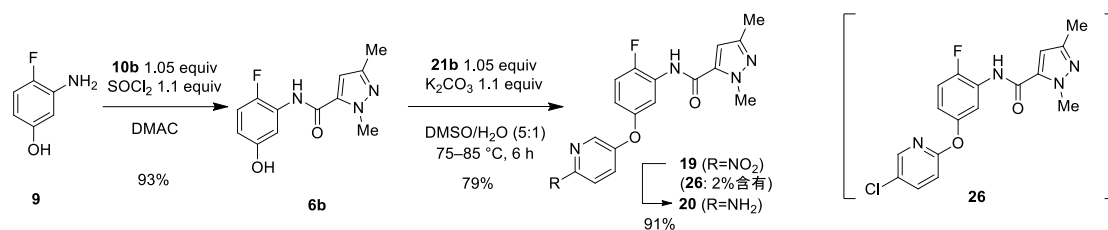
Scheme 7. 化合物 **3** の逆合成解析

最初に、アミノフェノール **9** の改良合成を行った。大量入手可能な **22** から、アシル化、ニトロ化、脱アシル化を経て、フェノール **25** を収率よく合成した。次に、**25** のニトロ基の還元および脱塩素化を効率よく行うために、接触還元について詳細な検討を行った。その結果、添加剤として NaOAc を加えて反応液の pH をコントロールし、さらにパラジウム触媒の量を最適化することにより、ベンゼン環が還元された副生成物の生成を防ぐことができ、収率よく **9** を製造する方法を見出した (Scheme 8)。



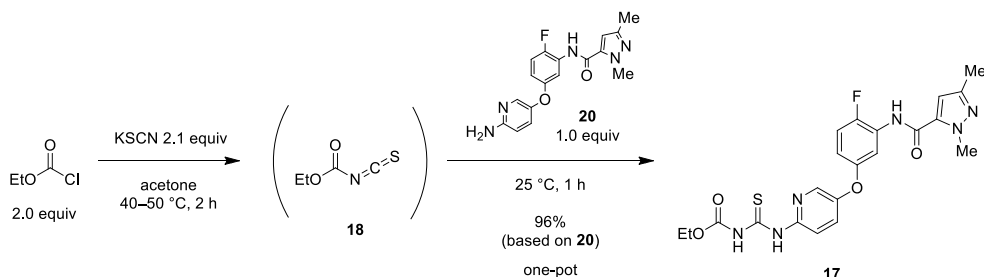
Scheme 8. アミノフェノール **9** の合成

次に、中間体 **19** の効率的合成を目指し、**21**、**9**、**10b** の連結順序を検討した結果、最終的に Scheme 9 に示した方法を採用した。すなわち、まず **9** とカルボン酸 **10b** から調製した酸クロリドよりフェノール **6b** を合成し、その後、クロロピリジン **21b** との S_NAr 反応を行った。この S_NAr 反応は、含水 DMSO/ K_2CO_3 の組み合わせを用いて行うことで反応における位置選択性 (**19** : **26** = 82 : 18) が向上し、さらに、EtOAc と *n*-heptane を用いて結晶化を行うことにより、目的の **19** を収率 79% (**26** を 2% 含有) で得ることができた。なお、ブロモピリジン **21a** を用いた S_NAr 反応は、満足のいく結果が得られなかった。続いて、**19** のニトロ基を還元してアミン **20** とした。この還元の後処理で行う晶析の際に、副生成物 **26** を除去することが可能であった。



Scheme 9. **19** と **20** の合成

次に、チオウレア **17** の合成を検討した。acetone 溶媒中、クロロギ酸エチルとイソチオシアン酸カリウム ($KSCN$) を反応させて *in situ* で **18** を調製し、ワンポットで中間体 **20** と反応させた。反応終了後、反応液に水を添加することで晶析を行い、続いて結晶を濾取することで純度の高い **17** を簡便、安全かつ高収率に得ることができた (Scheme 10)。

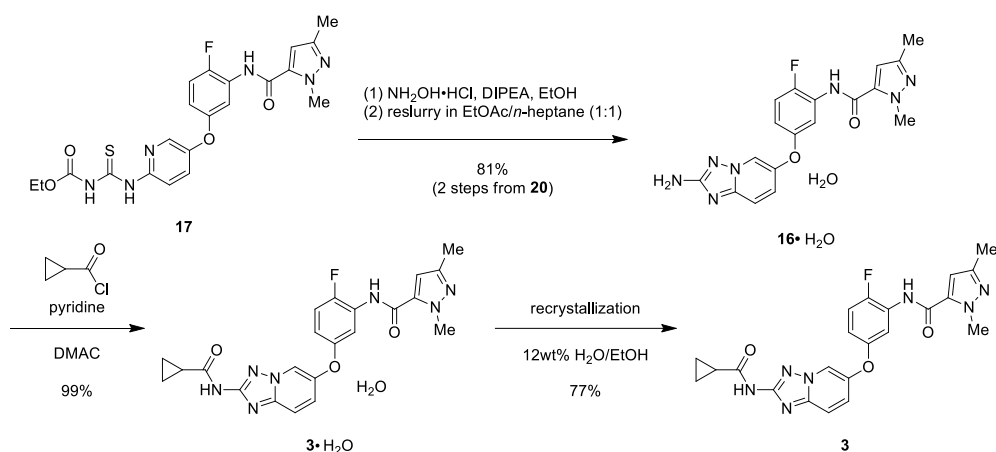


Scheme 10. チオウレア **17** の合成

チオウレア **17** とヒドロキシルアミンの反応によるトリアゾロピリジン環の構築はスムーズに進行したが、得られた **16**・ H_2O 中に硫黄の残留が確認された。残留硫黄除去法⁴の検討を行ったところ、EtOAc/*n*-heptane 中で懸濁攪拌を行うことで、効率よく硫黄を除去できることが明らかになった。最終工程における、**16**・ H_2O のシクロプロパンカルボニルクロリドを用いたアシル化反応については、ピリジンの添加が反応の進行に効果的であった。反応終了後、反応液に水と NaOH 水溶液を添加して pH を調整することで晶析を行い、続いて結晶を濾取することで、純度の高い **3**・ H_2O を収率よく得ることができた (Scheme 11)。

化合物 **3** には、2 種類の結晶形 (Form A, Form B) と 1 種類の擬多形 (**3**·H₂O) が存在することが知られており、⁵ 大スケールでも確実に開発形の Form A が得られる再結晶条件を設定することが必須であった。晶析溶媒として EtOH を選択し、貧溶媒の水の比率を変えて各結晶形の溶解度の測定を行ったところ、含水率 15%以下の領域で目的の Form A の溶解度が最も低くなり、Form A の結晶が安定的に得られることが分かった。スケールアップ製造に際しては 12%含水 EtOH 中で再結晶を行い、開発形の Form A の **3** を得ることに成功した。

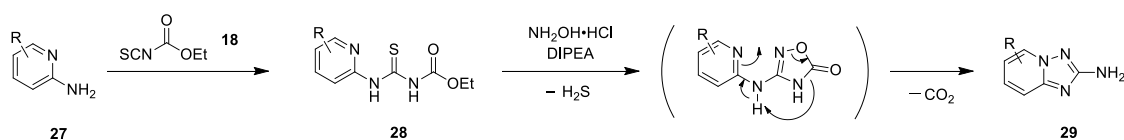
以上の詳細な検討の結果、**3**·H₂O までの総収率は 54%にまで向上し、創薬化学の合成における総収率 (25%) の 2 倍以上の値となった。各工程の操作は大きく簡略化され、危険な試薬の取り扱いや煩雑なカラムクロマトグラフィーによる精製を行うことなく、目的の **3** が得られる大量製造法を確立することができた。



Scheme 11. **3** の合成

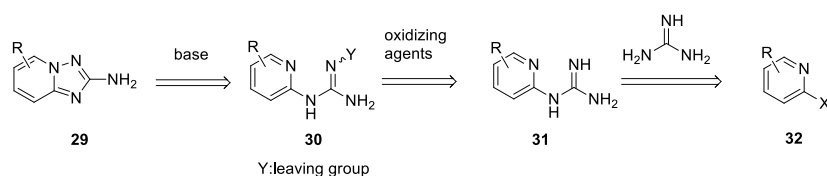
第 3 章 1-(ピリジン-2-イル)グアニジン誘導体の酸化的閉環反応による[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体の新規合成法の開発

化合物 **3** の母核となる[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体 **29** は、その特有の生理活性のために、医薬品の候補化合物として多くの注目を集めてきた。⁶ 化合物 **29** の最も一般的な合成法は、Scheme 12 に示すようなチオウレア **28** を経由する方法であり、⁷ 収率もよく、化合物 **3** の合成中間体 **16** の数百グラムスケールでの合成にも適用することができた。しかし、この合成法には、悪臭を持ち、毒性、腐食性、可燃性を有する H₂S が副生するという非常に大きな問題点が存在する。



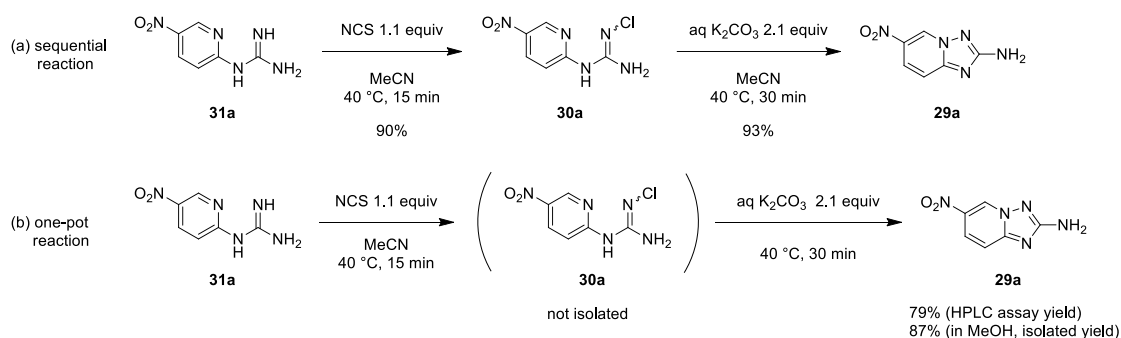
Scheme 12. [1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体 **29** の一般的合成法

筆者は H₂S の発生を伴わない、スケールアップ製造に適用可能な[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体 **29** の代替合成法の開発を計画した (Scheme 13)。すなわち、**29** は 1-(ピリジン-2-イル)グアニジン **31** の酸化反応により得られる **30** の閉環反応によって合成し、また、**31** は 2-ハロピリジン **32** とグアニジンの S_NAr 反応で合成するルートを考案することとした。



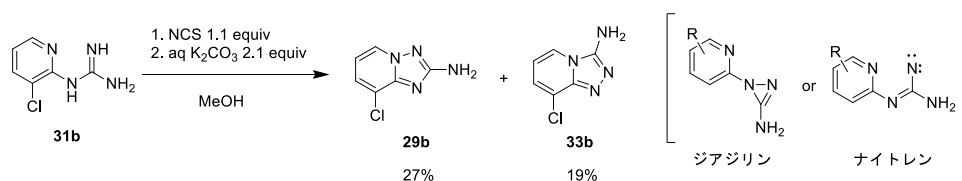
Scheme 13. 化合物 **29** の逆合成解析

これまで、**31** の酸化と続く **30** の塩基処理による閉環反応は報告例がない。そのため、このコンセプトの妥当性を検証するために、まずは既知化合物である 1-(5-ニトロピリジン-2-イル)グアニジン **31a** の *N*-クロロスクシンイミド (NCS) による塩素化と、中間体 **30a** の K_2CO_3 水溶液による閉環反応の検討を行った (Scheme 14 (a))。化合物 **31a** を、MeCN 中 NCS で処理することにより塩素化体 **30a** が得られ、**30a** を MeCN 中 K_2CO_3 水溶液で処理すると、目的の **29a** が収率よく得られることを見出した。以上の酸化、閉環の両反応とも、MeCN を溶媒として使用していることから、さらに検討を続けた結果、両反応をワンポット法に展開することができた (Scheme 14 (b))。さらに反応条件の最適化を行った結果、溶媒として MeOH を用いた場合に最も良い結果が得られ、単離収率が 87% にまで向上した。



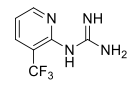
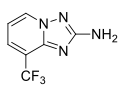
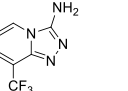
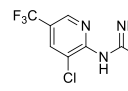
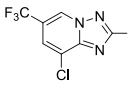
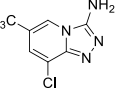
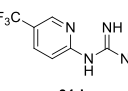
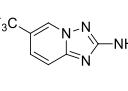
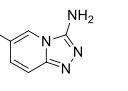
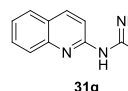
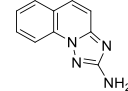
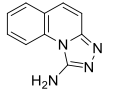
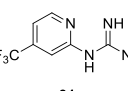
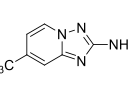
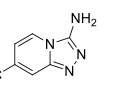
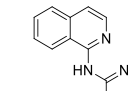
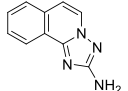
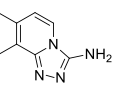
Scheme 14. **31a** からの **30a** を介した **29a** の合成

以上の結果をもとに、次にこの酸化的閉環反応の基質適用範囲を調べた。2-ハロピリジン **32** とグアニジンの $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ 反応により、電子求引基をもつ基質 **31** を合成し、MeOH を溶媒としてこのワンポットでの酸化-閉環反応を適用した。その結果、いくつかの基質において、目的の[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体 **29** だけではなく、[1,2,4]トリアゾロ[4,3-*a*]ピリジン-3-アミン誘導体 **33** が生成することを見出した (Scheme 15, Table 1)。この反応の反応機構としては、ジアジリン⁸ やナイトレン/カルボジイミド⁹ を経由する機構が考えられるが、詳細は不明である。この反応を用いることで、簡便な操作で[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体 **31** から 2 種類の有用な複素環を合成することが可能となり、本反応の今後の応用が期待される。



Scheme 15. **31b** の酸化的閉環反応

Table 1. 1-(ピリジン-2-イル)グアニジン誘導体 **31** の酸化的閉環反応

substrate			product		
					
31c	29c: 44%	33c: 20%	31f	29f: 57%	33f: 9%
					
31d	29d: 23%	33d: 52%	31g	29g: 20%	33g: 39%
					
31e	29e: 16%	33e: 50%	31h	29h: 35%	33h: 13%

(結論)

プロセス化学の見地から、VEGFR-2 阻害薬候補化合物の合成法の詳細な検討を行った。化合物 **1** と **2** の合成については、イミダゾピリジン **5** の保護基を使用しない簡便なワンポット合成法、および安価な原料を用いたピラゾール **10a** の効率的合成法を開発し、さらに **5** とフェノール **6** のカップリング反応が比較的温和な条件で進行するような反応条件を見出すことで、コンバージョンな **1** と **2** の高効率合成法を開発することに成功した。化合物 **3** の合成については、まず主要な出発原料となるアミノフェノール **9** について、**25** の接触還元を中心に合成法を改良し、化合物 **21**、**9**、**10b** の連結順序と反応条件を検討することで、カラムクロマトグラフィーによる精製を必要としない **19** の合成法を設定した。さらに、イソチオシアネート **18** を *in situ* で調製して、**20** とワンポットで反応させることで、**17** が安全かつ効率的に合成できることを見出し、最終的に創薬化学における合成の 2 倍以上の総収率で化合物 **3** を合成することに成功した。また、化合物 **3** の母核となる[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体の合成法を開発を行い、1-(ピリジン-2-イル)グアニジン **31** に対して、NCS と K₂CO₃ 水溶液を順次反応させる新規の酸化的閉環反応を見出した。この酸化的閉環反応の基質適用範囲を調べる過程で、目的の[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体だけでなく、その異性体に相当する[1,2,4]トリアゾロ[4,3-*a*]ピリジン-3-アミン誘導体也得られることも明らかにした。

(文献)

- (a) Yancopoulos, G. D.; Davis, S.; Gale, N. W.; Rudge, J. S.; Wiegand, S. J.; Holash, J. *Nature* **2000**, *407*, 242–248. (b) Ferrara, N. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 795–803. (c) Ferrara, N.; Gerber, H.-P.; LeCouter, J. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 669–676.
- (a) Miyamoto, N.; Sakai, N.; Hirayama, T.; Miwa, K.; Oguro, Y.; Oki, H.; Okada, K.; Takagi, T.; Iwata, H.; Awazu, Y.; Yamasaki, S.; Takeuchi, T.; Miki, H.; Hori, A.; Imamura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 2333–2345. (b) Oguro, Y.; Cary, D. R.; Miyamoto, N.; Tawada, M.; Iwata, H.; Miki, H.; Hori, A.; Imamura, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4714–4729.
- (a) Ishimoto, K.; Sawai, Y.; Fukuda, N.; Nagata, T.; Ikemoto, T. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 8564–8571. (b) Ishimoto, K.; Fukuda, N.; Nagata, T.; Sawai, Y.; Ikemoto, T. *Org. Process Res. Dev.* **2014**, *18*, 122–134. (c) Ishimoto, K.; Nagata, T.; Murabayashi, M.; Ikemoto, T. *Tetrahedron* **2015**, *71*, 407–418.
- (a) Taylor, E. C.; Berger, J. G. *J. Org. Chem.* **1967**, *32*, 2376–2378. (b) McCullough, R. D.; Belot, J. A.; Seth, J. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6480–6482.
- Oguro, Y.; Imamura, S.; Cary, D. R.; Okaniwa, M. WO 2008/150015 A1, 2008.
- (a) Bergamini, G.; Bell, K.; Shimamura, S.; Werner, T.; Cansfield, A.; Müller, K.; Perrin, J.; Rau, C.; Ellard, K.; Hopf, C.; Doce, C.; Leggate, D.; Mangano, R.; Mathieson, T.; O'Mahony, A.; Plavec, I.; Rharbaoui, F.; Reinhard, F.; Savitski, M. M.; Ramsden, N.; Hirsch, E.; Drewes, G.; Rausch, O.; Bantscheff, M.; Neubauer, G. *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 576–582. (b) Dugan, B. J.;

- Gingrich, D. E.; Mesaros, E. F.; Milkiewicz, K. L.; Curry, M. A.; Zulli, A. L.; Dobrzanski, P.; Serdikoff, C.; Jan, M.; Angeles, T. S.; Albom, M. S.; Mason, J. L.; Aimone, L. D.; Meyer, S. L.; Huang, Z.; Wells-Knecht, K. J.; Ator, M. A.; Ruggeri, B. A.; Dorsey, B. D. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 5243–5254. (c) Cleghorn, L. A. T.; Woodland, A.; Collie, I. T.; Torrie, L. S.; Norcross, N.; Luksch, T.; Mpamhanga, C.; Walker, R. G.; Mottram, J. C.; Brenk, R.; Frearson, J. A.; Gilbert, I. H.; Wyatt, P. G. *ChemMedChem* **2011**, 6, 2214–2224.
7. (a) Verček, B.; Ogorevc, B.; Stanovnik, B.; Tišler, M. *Monatsh. Chem.* **1983**, 114, 789–798. (b) Nettekoven, M.; Püllmann, B.; Schmitt, S. *Synthesis* **2003**, 1649–1652.
8. Graham, W. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1965**, 87, 4396–4397.
9. (a) Tiemann, F. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1891**, 24, 4162–4147. (b) Yamamoto, Y.; Mizuno, H.; Tsuritani, T.; Mase, T. *Tetrahedron Lett.* **2009**, 50, 5813–5815.

論文審査の結果の要旨

VEGFR-2 キナーゼ阻害薬の候補化合物である、3 種類の化合物の効率的な製造法開発を目指してプロセス化学研究を行った。これらの化合物の特徴として、VEGFR-2 キナーゼ阻害薬として新規のケモタイプとなる、6 位にエーテル結合、2 位にアミノ基を持つ、イミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン（化合物 **1**, **2**）、および[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン（化合物 **3**）を母核に持つことが挙げられる。化合物 **1** と **2** の合成については、中心骨格となるイミダゾ[1,2-*b*]ピリダジン-2-アミンの、イミドを用いた新規のワンポット合成法を開発し、フェノールとのカップリング反応が比較的温和な条件で進行する反応条件を見出すことで、コンバージョンで高効率な合成法の開発に成功した。化合物 **3** の合成については、主要な出発原料の 3-アミノ-4-フルオロフェノールの大量合成法を開発し、カラムクロマトグラフィー精製を必要としない、5-クロロ-2-ニトロピリジンの 5 位選択的なエーテル化反応の条件を見出すことで、[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン骨格の効率的な構築が可能となり、最終的に創薬化学における合成法の 2 倍以上の収率で **3** が得られる合成法を確立した。さらに、化合物 **3** の中心骨格である、[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミンの別途合成法の検討を行って、1-(ピリジン-2-イル)グアニジン誘導体の新規酸化的閉環反応を見出し、基質によって[1,2,4]トリアゾロ[1,5-*a*]ピリジン-2-アミン誘導体だけでなく、その異性体に相当する[1,2,4]トリアゾロ[4,3-*a*]ピリジン-3-アミン誘導体也得られることも明らかにした。

上記の論文は博士（薬学）論文として、適当と判定する。