

博士学位論文

抗C型肝炎ウイルス剤 CH4630808 の

製造プロセス開発

三重大学 大学院工学研究科

博士後期課程 材料科学専攻

羽石 剛

目次

| | |
|---|--------------|
| 第1章 序論 | ・ ・ ・ ・ ・ 1 |
| 第1節 緒言 | ・ ・ ・ ・ ・ 1 |
| 第2節 NA 255 の構造最適化と CH4630808 発見の経緯 | ・ ・ ・ ・ ・ 6 |
| 第3節 アルドール反応を鍵反応とする化合物 25 の合成 | ・ ・ ・ ・ ・ 12 |
| 第2章 検討方針 | ・ ・ ・ ・ ・ 15 |
| 第1節 スループロセスのメリット・デメリットと原薬中不純物に関する ガイドライン | ・ ・ ・ ・ ・ 15 |
| 第2節 初期ルートとスケールアップ上の改善点 | ・ ・ ・ ・ ・ 18 |
| 第3節 化合物 29 中に含まれる不純物解析と生成機構 | ・ ・ ・ ・ ・ 22 |
| 第3章 製造に向けた製法改良（第1工程～第3工程） | ・ ・ ・ ・ ・ 24 |
| 第1節 第1工程の検討 | ・ ・ ・ ・ ・ 24 |
| 第2節 第2工程の検討 | ・ ・ ・ ・ ・ 26 |
| 第3節 第3工程の検討 | ・ ・ ・ ・ ・ 34 |
| 第4節 小括 | ・ ・ ・ ・ ・ 35 |
| 第4章 製造に向けた製法改良（第4工程～第8工程） | ・ ・ ・ ・ ・ 36 |
| 第1節 第4工程の検討 | ・ ・ ・ ・ ・ 36 |

| | |
|----------------------|---------------|
| 第2節 第5工程の検討 | ・ ・ ・ ・ ・ 39 |
| 第3節 第6工程の検討 | ・ ・ ・ ・ ・ 41 |
| 第4節 第7工程の検討 | ・ ・ ・ ・ ・ 42 |
| 第5節 第8工程の検討 | ・ ・ ・ ・ ・ 58 |
| 第6節 小括 | ・ ・ ・ ・ ・ 63 |
| 第5章 結論 | ・ ・ ・ ・ ・ 66 |
| 謝辞 | ・ ・ ・ ・ ・ 68 |
| Experimental section | ・ ・ ・ ・ ・ 69 |
| 単離不純物のスペクトルチャート | ・ ・ ・ ・ ・ 75 |
| 関連論文 | ・ ・ ・ ・ ・ 100 |
| 参考文献 | ・ ・ ・ ・ ・ 101 |

第1章 序論

第1節 緒言

C型肝炎ウイルス（HCV）は、世界中の大部分の輸血後肝炎の症例と、かなりの割合の散在性（または地域社会獲得性）肝炎の症例の原因となる非経口的に伝染するウイルスであり、感染者は世界で1～2億人、日本国内では200万人以上と推測されている。

C型肝炎はHCVの感染により引き起こされる疾病で、HCV感染者の約70%が持続感染者となり慢性肝炎に移行し、そのうち約20%が感染後30年たって肝硬変、肝がんとなる。肝がんの約90%の原因がC型肝炎といわれている¹⁾。日本国内では毎年2万人以上の患者がHCV肝炎に伴う肝がんにより死亡している。

HCVは1989年に輸血後の非A非B型肝炎の主要な原因ウイルスとして発見された。HCVはエンベロープを有するRNAウイルスで、そのゲノムは一本鎖（+）RNAからなりフラビウイルス科のヘパチウイルス（Hepacivirus）属に分類される。

HCVの宿主免疫機構回避の機序はいまだ明らかではなく、免疫機構の発達した大人に感染した場合でも、持続感染が成立することが多い。HCV感染者の症状は、通常肝炎から始まり、上記持続感染により多くの場合、慢性肝炎、肝硬変、肝細胞癌へと進展する。肝細胞癌まで進展した場合、手術により患部を摘出しても、非癌部で引き続き持続感染が起こるため、肝細胞癌再発の危険性は高い。

このようなHCV感染者において、HCVの産生や増殖を抑制する方法、又はHCVを消失させる方法としては、従来、インターフェロン療法が有効とされている。現在の標準療法であるペグ化インターフェロンとリバビリンの併用治療ではその奏成功率は約50%に留まっている²⁾。最近、HCVプロテアーゼ阻害剤との3剤併用療法の導入により、奏成功率の改善が報告されているもの

の、ウイルスの遺伝子変異による耐性株出現の懸念があるため、更に安全で有効性の高い治療薬の開発が強く望まれている。

近年 HCV 遺伝子クローニングによる各ウイルスタンパク室機能の分子生物学的解析の急速な発展を背景として、HCV 選択的抗ウイルス薬の開発が進んでいる。中でも NS3/4a プロテアーゼ阻害薬、ポリメラーゼ阻害薬の開発が進んでおり、プロテアーゼ阻害薬は標準療法との併用により高い効果が確認されつつあり、新たな薬剤に期待が寄せられている。一方、宿主因子を標的として抗ウイルス効果を示す薬剤は、免疫賦活作用増強を指向した薬剤が各種開発中であるものの、明確な効果を示すに至っていない。

新規抗 HCV 剤の探索研究は、ウイルス自身の持っている NS3 プロテアーゼおよび RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B などのウイルスの増殖に必要な酵素を標的因子とした Target-based スクリーニングと、宿主因子を標的とした Cell-based スクリーニングに大別できる³⁾。Target-based スクリーニングによって見出される阻害剤はその標的が明確であること、三次元構造情報が利用できることが利点であり、合理的に分子レベルから創薬研究を行うことができる。しかし、一本鎖 RNA を遺伝子にもつ HCV は非常に高い頻度で遺伝子変異を起こし、薬剤耐性を獲得する。このため、このような阻害剤は長期間の使用に耐えられないことが多い⁴⁾。一方、Cell-based スクリーニングから見出される宿主因子を標的とした阻害剤の場合、宿主因子はほとんど変異を起こさないため、ウイルスを完全に排除するまでの長期間の投与が可能になると考えられる。しかし、医薬品として開発する場合、その標的分子を解明する必要がある。また、スクリーニングの対象化合物としては一般的に合成化合物ライブラリーから見出されるリード化合物は複雑な化学構造を有する者が多く、構造最適化による活性の増強や物性改善の難易度は高いものの、天然物由来の多くの医薬品は創薬化学者では考えられないようなユニークな構造と強い活性を持った化合物が得られるといった魅力がある。

このような背景をもとに、中外製薬において宿主タンパクを標的とした新規抗 HCV 薬の開発研究が行われ、天然物ライブラリーを用いた Cell-based スクリーニングから強力な抗レプリコン活性を有する NA 255 という新たな抗 HCV 薬剤のシードを見いだした。⁵⁾

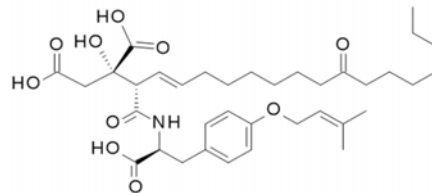


Figure 1. Structure of NA 255

次に、NA 255 の HCV レプリコン阻害活性の作用機序を解明するため、HCV レプリコンの複製に必須と考えられている各ウイルス酵素に対する阻害効果を検証した。その結果、プロテアーゼ、ヘリカーゼ、ポリメラーゼに対し有意な阻害効果は認められなかった。次に、抗 HCV 活性が知られているインターフェロンとの類似作用の有無を確認するため、インターフェロンが誘導する抗ウイルス遺伝子として知られる PKR (RNA-dependent protein kinase)⁶⁾、2' -5' - oligoadenylate synthase)⁷⁾、RNase L⁸⁾の発現を確認したが、いずれも有意な誘導は観察されなかった。以上の結果より、NA 255 は新規の作用機序を持つ抗 HCV 化合物と考えられたため、さらなる解析を実施した。化学構造検索を行い、NA 255 の化学構造がセリンパルミトイル転移酵素 (SPT) 阻害剤として知られていたミリオシン⁹⁾に類似していることに着目した。SPT は、パルミトイル CoA とセリンとの縮合反応からスタートするスフィンゴ脂質合成経路の初発酵素である¹⁰⁾。(Figure 2)

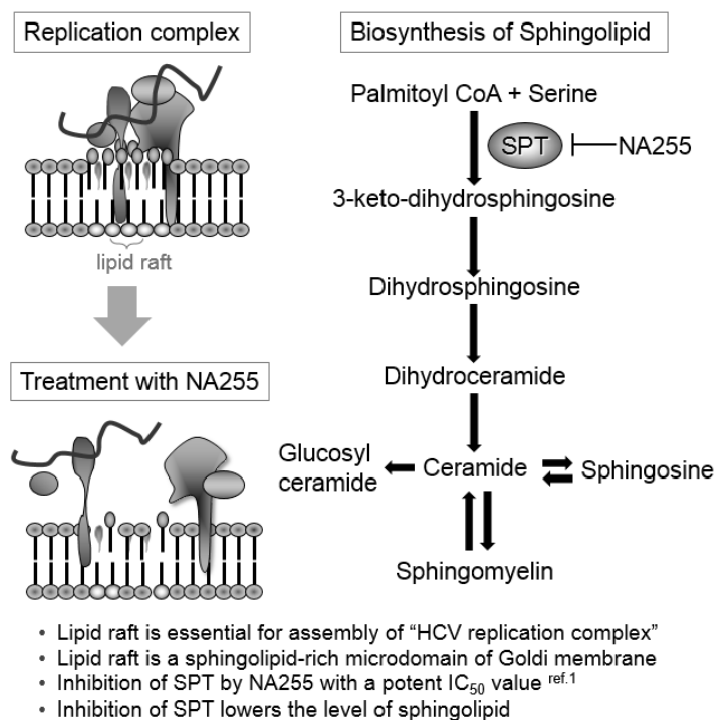


Figure 2 NA 255 の作用機序

NA 255 の in vitro での SPT 阻害活性を調べたところ、予想通り IC₅₀ 値が 10nM と強い阻害活性を示した。また、細胞内での SPT 阻害に伴い、de novo 合成されたセラミドやスフィンゴミエリン量の減少も認められた。siRNA を用いて、HCV レプリコン保持細胞の SPT 発現を抑制したところ、抗 HCV レプリコン効果が確認された。さらに、既知の SPT 阻害剤であるミリオシンやセラミド合成阻害剤フモニシン B1 も抗 HCV レプリコン阻害活性を示すこと、またスフィンゴ脂質生合成経路中間体スフィンガニンなどを培養細胞系に加えることにより、NA 255 の抗 HCV レプリコン効果が減弱することが確認された。これらの結果より、スフィンゴ脂質の de novo 合成が HCV 複製に深く関与しており、スフィンゴ脂質生合成経路を遮断することは、新たな HCV 治療薬のアプローチになりうることを示唆された。

哺乳類細胞において、小胞体で合成されたセラミドはゴルジ体に輸送され、その場でスフィンゴミエリンに変換される¹¹⁾。変換されたスフィンゴミエリンは、コレステロールなどとともに

に HCV 複製の足場となる脂質ラフトと呼ばれる構造を形成する¹²⁾¹³⁾。培養細胞系において、小胞体からゴルジ体へのセラミドの輸送阻害剤として知られる HPA-12¹⁴⁾や、コレステロール合成阻害剤であるロバタスタチンも抗 HCV レプリコン阻害活性を示すことが見いだされた。さらに、HCV 複製と脂質ラフトの関係を明らかにすべく NA 255 処理した細胞抽出物を用いて脂質ラフトを分画したところ、HCV 複製に関与するウイルスタンパク質の一つである HCV RNA ポリメラーゼタンパク質 (NS5B) の顕著な減少を認めた。このように、NA 255 は脂質ラフトの主要成分であるスフィンゴミエリンの生合成を阻害し、HCV 複製複合体の重要な足場を失わせることで抗ウイルス効果を発揮するという新規作用機序を持つ抗 HCV ウイルス薬であることが明らかとなった。¹⁵⁾

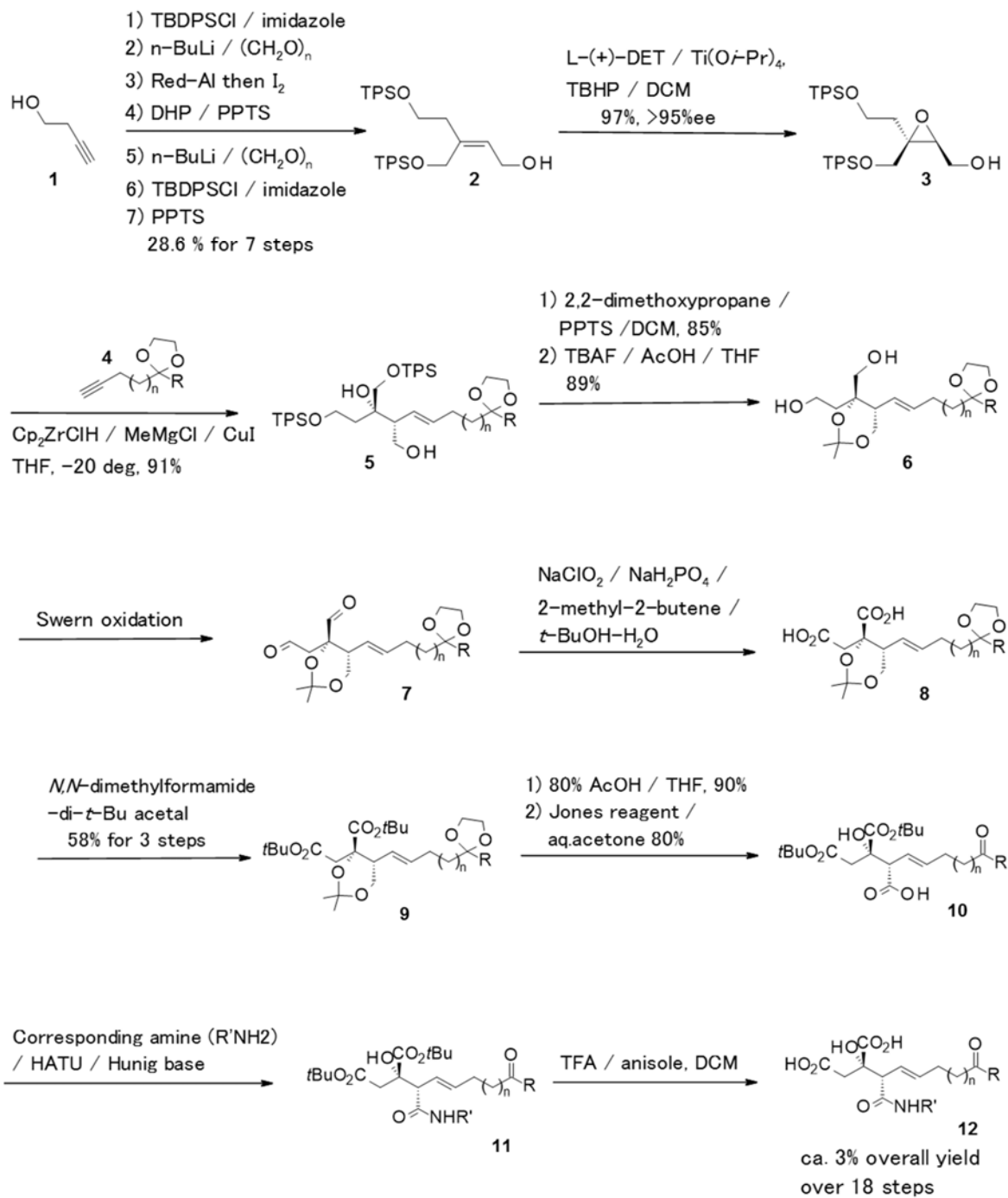
第2節 NA 255 の構造最適化と CH4630808 発見の経緯

次に、NA 255 をリード化合物として設定し、より高活性で安全性の高い化合物を探索すべく構造最適化研究が行われた。この時に用いた合成法に関して以下に述べる。

まず、NA 255 を原料とした誘導化検討では、NA 255 が酸性条件化において不安定であり、Viridofungin A¹⁶⁾に変換されること、(3*S*, 4*S*, 2' *S*) の絶対配置を持つこと、主鎖 (*E*)-オレフィンとトリカルボン酸が高活性発現に重要であることを明らかにした。しかしながら、さらに詳細な構造活性相関の解明と構造最適化を実施するにあたり、発酵法による NA255 の供給が容易でないことから、その不斉合成法の確立に着手した。

すなわち、当時畑山らにより報告されていた Viridofungin trimethyl ester の全合成^{17) 18)}を参考にすることにした。また、畑山らは同時に Viridofungin trimethyl ester のトリメチルエステル部位はアルカリ条件における Viridofungin A への加水分解が極めて困難であることを報告している。そこで、官能基の導入と、エステル保護基の改良を行うことで様々な誘導体展開を可能にする一般的合成法を開発した。

すなわち、3-butyn-1-ol (**1**)を出発原料として用い、7 工程で誘導されるアリルアルコールに対し、まず Sharpless エポキシ化によってキラルな epoxide (**3**)を合成、この epoxide に対し側鎖 (*E*)-アルケニル基の導入を目的として、末端アセチレンのヒドロジルコニウム化とその Grignard 試薬へのトランスメタル化、続いて銅(I)触媒によるエポキシドの位置選択的開環反応を確立し¹⁹⁾、その後脱保護された2つの1級水酸基を同時に酸化、またカルボン酸の保護基として *t*-ブチルエステルを用いるという合成法である。



Scheme 1. NA 255 の構造最適化に用いたルート

総工程は 18、通算収率は 3%程度ながら、この合成法を用いることにより多くの部位における構造変換が可能となった。この方法を用いて構造最適化研究を展開し、レプリコン阻害活性と細胞毒性を指標として、延べ 300 種類以上の誘導体を合成し、評価することができた。

この結果、得られた構造活性相関の概要を以下に示す²⁰⁾。

側鎖長に関して

側鎖長は炭素鎖 7 個が最も活性が強く、8 個では 2 倍、逆に 6 個では 10 倍の活性低下がみられたことより、7 個が最も高活性であることが分かった。

カルボニル基に関して

カルボニル基の位置がシフトすることは許容するものの、2 級アルコールに変換すると活性は低下し、メチレン鎖とした場合さらに減弱したことより、カルボニル基が最良であると結論した。

(E)-olefin に関して

還元された単結合の化合物は 100 倍の活性減弱となり、この部分は (*E*)-olefin であることが必要であった。

Tri-carboxylic acid moiety に関して

Tri-methyl ester 化合物には活性が全く見られず、また、アミノ酸部分の立体科学は (S)-CO₂H が活性発現に重要であることが分かった。

アミノ酸部分の置換基

4 位に脂溶性置換基を有する非天然 L-フェニルアラニン誘導体が強いレプリコン阻害を示すことを見出した。

このようにして NA 255 からの誘導体展開で得られた構造活性相関をまとめると以下のようになる。

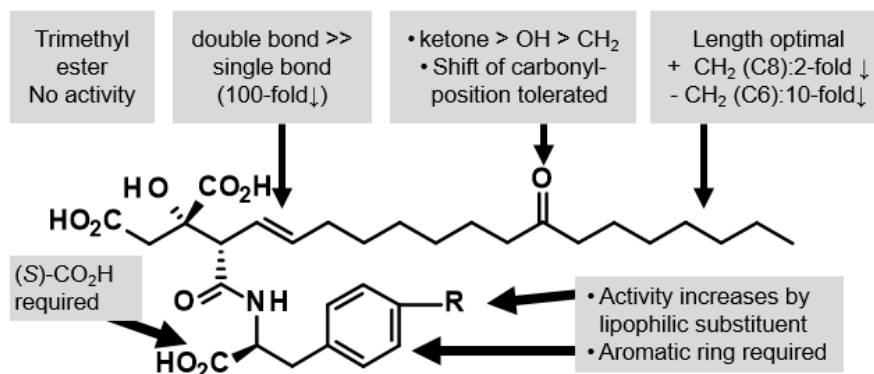


Figure 3. NA 255 誘導体の構造活性相関

NA255 をリード化合物とした誘導体合成を行った結果、CH4630808 は *in vitro* 評価において、高い安全性と強いウイルス複製阻害効果を示し、Pegasys と相乗的効果を示した。構造と *in vitro* の薬効、安全性データを以下に示す。

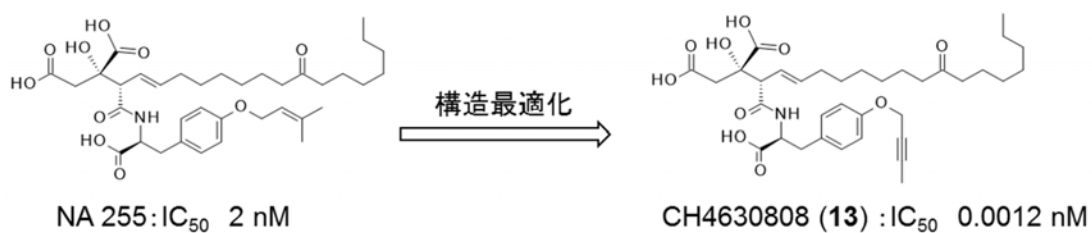


Figure 4. NA 255 をリードとした CH 4630808(13) の発見

- ***In vitro* efficacy**
 - Hepatitis C virus replication from genome
 - Luciferase IC_{50} ~0.002 μ M
 - Northern IC_{50} < 0.01 μ M
 - Human SPT IC_{50} 0.004 μ M
 - Combination with Pegasys:
 - ✓ synergistic
 - Required time to cause inhibition: 3~5 days

- ***In vitro* safety profile**
 - Cytotoxicity >20 μ M
 - Cell-cycle No effect (@20 μ M)
 - hERG Negative (@1 μ M)
 - Immunosuppression >5 μ M
 - CYP3A4 inh. >30 μ M
 - microAMES Negative

Figure 5. CH4630808 (13) の活性と安全性データ

また、CH4630808 はキメラマウス薬効モデルにおいて、遺伝子型によらない強いウイルス複製阻害効果を濃度依存的に示した。また、肝細胞中のスフィンゴ脂質を濃度依存的に低下させたことから、宿主 SPT 阻害剤が C 型肝炎において有効な治療手段となりうることが示された。

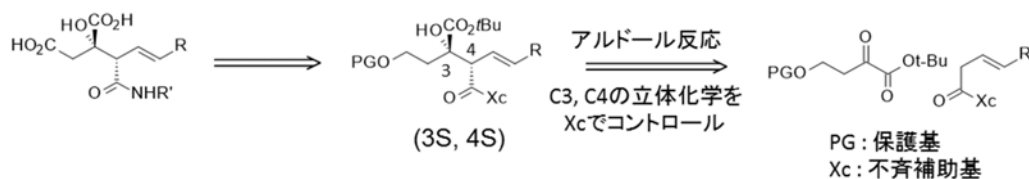
また、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだ HCV 型レプリコン細胞を使用し、CH4630808 を添加しルシフェラーゼを計測することで複製抑制効果を検討した。また、HCV ジェノタイプ 1a、2a を感染させたキメラマウスに、CH4630808 5mg/kg、10mg/kg を 14 日間投与した。

その結果、CH4630808 は強力な抗 HCV 効果を *in vitro*、*in vivo* の実験系で示した。さらに、その影響は肝臓内ではみられたものの、血清中では認められず、肝臓に対する特異性があることが推測された。CH4630808 は作用機序が既存の薬剤と全く異なるものであり、多剤併用療法に新しい選択肢を与えることができると考えられた。

このような経緯で最終的に活性と安全性に優れた CH4630808 を開発化合物として選択し、この化合物における臨床試験が中外製薬によって行われることとなった。この原薬供給のため、kg スケール製造可能なプロセス開発研究を行うこととした。

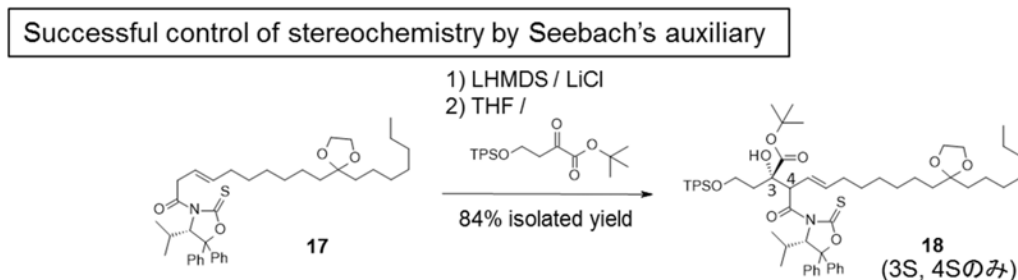
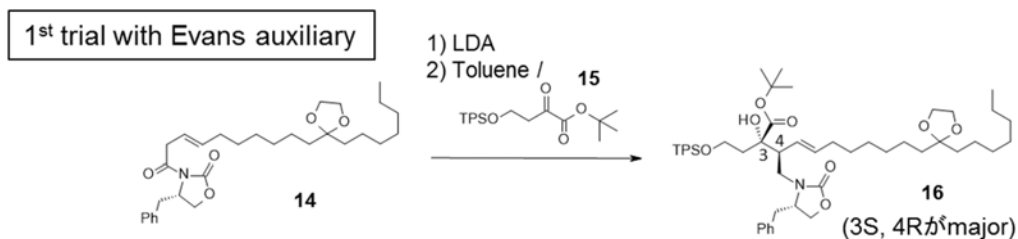
第3節 アルドール反応を鍵反応とする化合物 25 の合成

臨床開発候補化合物が CH4630808 に絞られたことより、より大量製造に適した収斂型の合成法が中外製薬にて検討され確立された。すなわち、隣接する2つの不斉中心の構築にアルドール反応を適用する方法である。



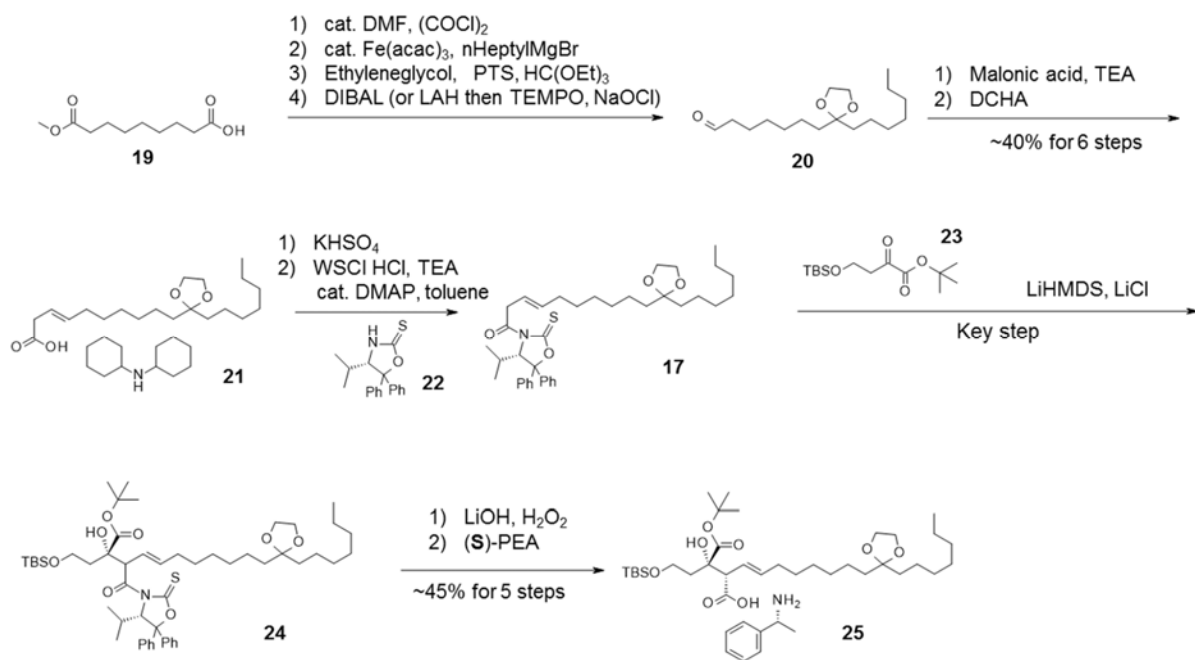
Scheme 2. 3, 4位の不斉合成戦略

このような α -ケトエステルを用いた立体選択的アルドール反応例は当時知られていなかったため、まず Evans の不斉補助基を用いて検討を行ったところ、望まない(3S, 4R)ジアステレオマーが優先的に得られることが分かった。この結果をイス型遷移状態モデルに基づいて考察したところ、不斉補助基の5位に反応場に向かってかさ高い置換基を配置すればジアステレオ選択性を逆転させることも可能と考えられたことより、不斉補助基を中心に種々検討した結果、Seebach^{21) 22)}らにより開発された改良型 Evans 不斉補助基を用いることで望みの立体化学でアルドール反応が進行することが見いだされた。また、本反応において塩化リチウムの添加は反応転化率とエノラート面選択性の劇的な改善が見られた。



Scheme 3. 各不斉補助基におけるジアステレオ選択性

このようにして完全な立体制御を実現できたことより、ほかの工程も合わせて大量合成可能な製法を指向した検討を行った結果、カラム精製を行うことなく化合物 **25** を取得できるルートを確認することができた²³⁾²⁴⁾。すなわち、Azelaic acid monomethyl ester (**19**) を出発原料とし、まずカルボン酸部位を酸クロライドとし、鉄触媒存在下グリニャール試薬との反応を行う。次にケトンの保護、エステルをアルデヒドへ還元し、増炭したのちに結晶化を用い化合物 **21** を取得、不斉補助基を導入したのちに前述の鍵反応を行い望みの立体を構築、引き続き不斉補助基を除去したのちに結晶化精製をすることで化合物 **25** を合成することができている。



Scheme 4. 化合物 25 の大量合成法

第2章 検討方針

第1節 スループロセスのメリット・デメリットと原薬中不純物に関するガイドライン

医薬品原薬製造においては、その前半工程はリソースの節約とスピードアップを図る目的で外製を用いることが多い。一方、最終原薬の品質制御は人体に投与するという観点から最も重要視される要素であるため、これにかかわる最終工程、またはそれにつながる後半工程は内製で行われるのが一般的である。

また一方上記化合物 **25** の合成においては、超低温反応の必要がある工程を含んでおり、設備面で自社製造は不可能であったことより、実施可能な社外に製造を委託することとした。

一方、後半4工程を含む7工程は社内で実施することになり、この部分のプロセス開発研究を行うこととなった。

このルートの特徴として、中間体の結晶性が悪いことがわかっており工程ごとの結晶化精製が困難であることが予想された。このため、テレスコーピング反応等の連続操作を多用するプロセスになることが想定された。

一般的にワンポット反応、テレスコーピング反応などのスループロセスは溶媒量の削減、製造期間の短縮等、生産性の向上に寄与する可能性が高い一方、晶析を用いる精製機会が少ないということも同時に意味しており、それだけ原薬品質のコントロールが難しくなるというリスクがある。また、外製によって供給される化合物 **25** は高価であることより、できるだけ化合物のロスを抑えることが経済的な面から望まれた。

スループロセスのメリット・デメリット

メリット

- 単離工程がないので、大幅な業務効率化、省資源につながる
 - ✓ ろ過機洗浄、その洗浄確認の溶媒、時間、マンパワー
 - ✓ 晶析による化合物ロスが少なくなる

デメリット

- 晶析精製の機会を失うことで、品質コントロールが難しくなる
 - ✓ 反応、液液分離などで不純物抑制をよりデリケートに行う必要がある
- 検討結果が工程を超えて連動するので、製法検討が複雑になる

Figure 6. 医薬品製造におけるスループロセスのメリット・デメリット

一方、医薬品原薬中には一定量以上の不純物が混入した場合、混入量に応じてとるべき対応のガイドラインが示されている。特に、1日の原薬最大投与量が2g以下の薬剤において0.10%を超える場合は構造決定が必要となる。さらに、0.15%を超える不純物が混入した場合、当該不純物別の安全性確認が必要となり、開発スケジュールに影響を及ぼす可能性が高くなる。このガイドラインは承認申請に際しての指針を示したものであり、治験に用いる原薬に適用することを意図して作成されたものではないが、治験参加者を保護する目的から、治験原薬においてもこの閾値がそのまま新規不純物の規格として設定されていることが多い。今回CH4630808の治験薬製造でも個別不純物の上限値は0.15%に設定されたことより、これ以上の不純物を原薬に含まない製法の確立を目指すこととなった。

医薬品原薬中の不純物に関するガイドライン

(厚生労働省医薬局審査管理課長通達 医薬審発第1216001号より引用)

| 1日最大投与量*1 | 報告の必要な閾値*2,3 | 構造決定の必要な閾値*3 | 安全性確認の必要な閾値*3 |
|-----------|--------------|--------------------------------|--------------------------------|
| ≤2g/日 | 0.05% | 0.10%又は1日摂取量1.0mg (どちらか低い方) | 0.15%又は1日摂取量1.0mg (どちらか低い方) |
| >2g/日 | 0.03% | 0.05% | 0.05% |

*1 1日当たりの原薬の摂取量

*2 これより高い閾値を用いる場合は、化学的妥当性を示すこと。

*3 非常に毒性の強い不純物については、これよりも低い閾値が妥当な場合もある。



- 医薬品製造においては厳密な不純物の管理が要求される
- 安定して不純物が制御できる製法確立が必要

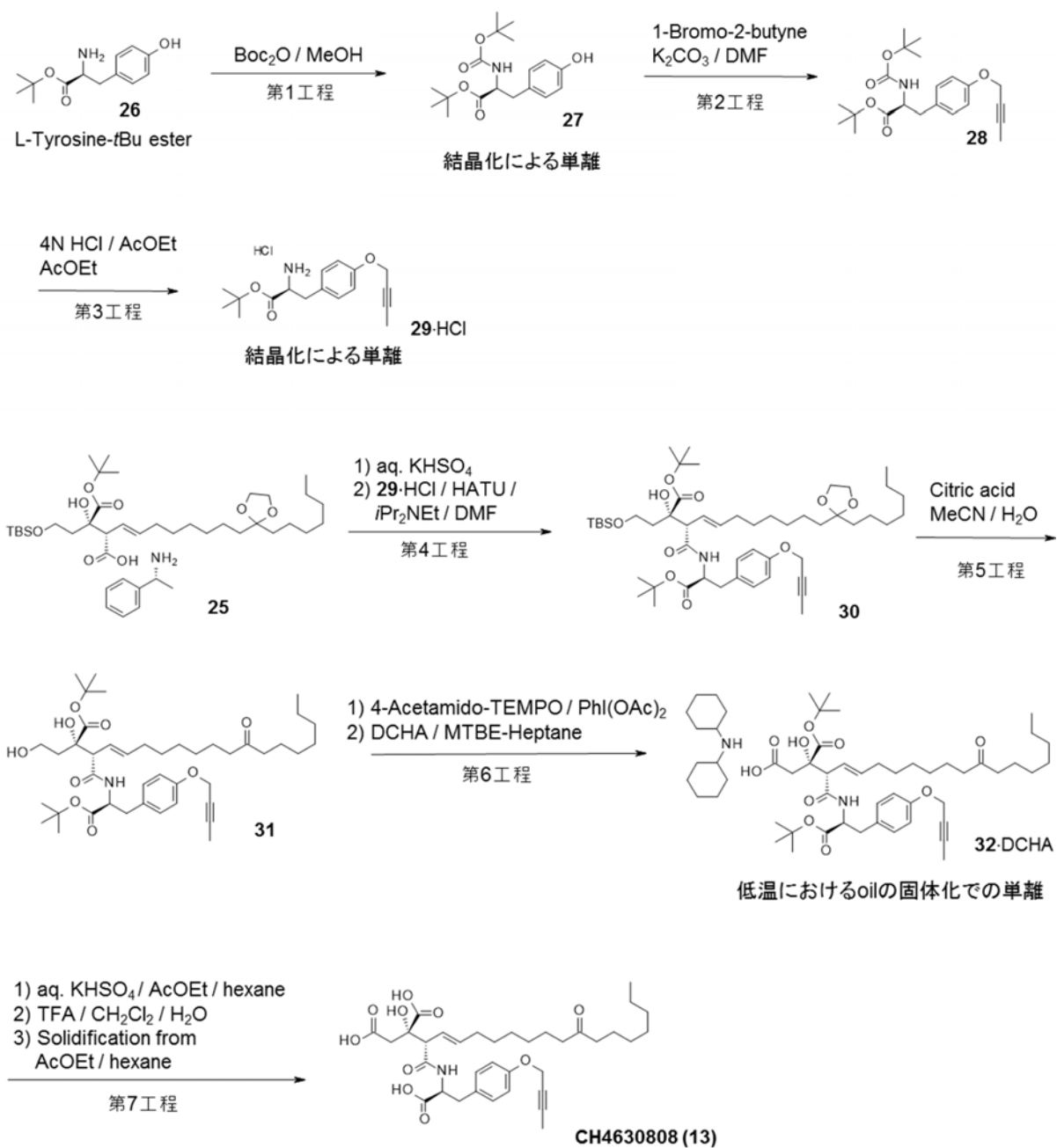
Figure 7. 医薬品原薬中の不純物に関するガイドライン

そこで、ワンポット反応、テレスコーピング反応などのスループロセスのさらなる最適化を進め、プロセスの生産性向上を目指しつつ、同時に少ない取り出し回数の中で、原薬品質を安定的に確保できる堅牢なプロセス確立を目指すという相反する2つの課題に同時に取り組んでいくという方針で研究を進めることとした。

その結果、数種の原薬中不純物の解析、生成原因の究明と、それを基にした不純物制御に関する検討を行い、本中間体を經由するルートを用いて工業化研究を行い、治験薬製造を行うことになった。

第2節 初期ルートとスケールアップ上の改善点

まず、初期の製造ルート (initial route) を以下に示す²⁰⁾⁻²⁴⁾。



Scheme 5. 初期の製造ルート (initial route)

L-チロシン *t*-Bu エステル **26** を出発化合物として使用し、まず MeOH 中で Boc₂O と反応させて Boc 保護アミノ酸 **27** を結晶として単離した(第 1 工程)。

次に、DMF 中で 1-bromo-2-butyne および炭酸カリウムで O-アルキル化を行い(第 2 工程)、得られた油状物質は液 - 液分離により無機物等を除去するのみで単離精製することなく AcOEt 中 HCl を用いて N-Boc 基の選択的脱保護を実施、分液操作ののち再度 HCl による晶析を行うと、化合物 **29** が塩酸塩として得られる(第 3 工程)。

次いで、外部製造委託先で製造したカルボン酸 **25** のフェネチルアミン塩を液 - 液分離しフリー体とし、次いで DMF 中 HATU / DIEPA を用いて化合物 **29** の塩酸塩とアミドカップリングさせ(第 4 工程)、得られた油状物質を精製することなく、アセトニトリル-水中 60°C の条件でクエン酸を作用させることにより TBS 基およびケタールを同時に脱保護を行うことで油状物の **31** を得た(第 5 工程)。

この油状物を精製することなくヨードベンゼンジアセテートを共酸化剤として用いる TEMPO 酸化²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾を行ったのち、ジシクロヘキシルアミンとの塩形成晶析を行うことにより化合物 **32** を固体として得ることができた(第 6 工程)。

最後に、液 - 液分離による脱塩後、ジクロロメタン中 TFA にて *t*-Bu エステルを開裂し、最後に酢酸エチル-ヘキサンにより結晶化を行い、最終化合物 CH4630808 をフリー体として得る(第 7 工程) というものである²⁸⁾。

この initial ルートでは、大量合成に適用が困難な操作を含んでいた。すなわち、第 6 工程における化合物 **32** のジシクロヘキシルアミン塩の晶析操作である。この晶析操作では、第 4 工程から第 6 工程由来の不純物を除くことができることより重要な精製ポイントとなるが、通常

反応釜を用いる大スケールでは行われたい、低温 5°C におけるオイルアウトからの固体化という操作であり、スケールアップ、および再現性での懸念があった。

このことより、この工程での晶析操作を避けることとし、この工程も含め第 4 工程から第 7 工程までの 4 工程をスループロセスで行うこととした。

精製ポイントを一つ減らすことで操作数が減少し、特に単離精製操作をスキップすることは大幅な作業効率の改善につながるものの、取得原薬の品質低下も当然予想される。

そこで、原薬品質を担保するため、不純物解析を基盤とするプロセス改良により行うことにした。

これはすなわち以下に示すような方法である。まず中間体 29 および API 中に含まれる不純物を単離し、NMR, MS 等で構造決定を行う。次にその構造の生成原因を推測、その工程でその原因となる化合物が生成しているか確認する。そして実際のプロセスにその対策を組み込むことで不純物が抑制できることを確認する、という方法である。

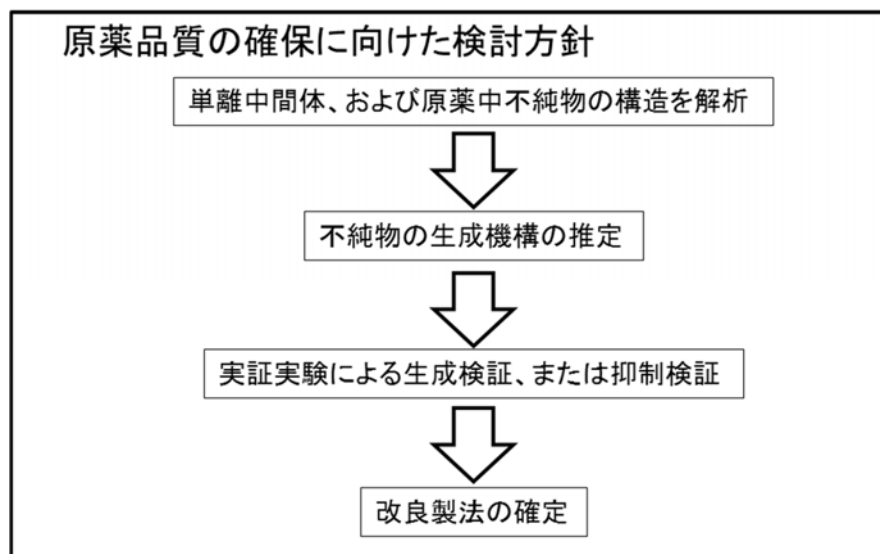


Figure 8. 原薬品質の確保に向けた検討方針

また同時に、工業化に向けて製造プロセスの効率化、安全面に関する改良も同時に進めていくことにした。

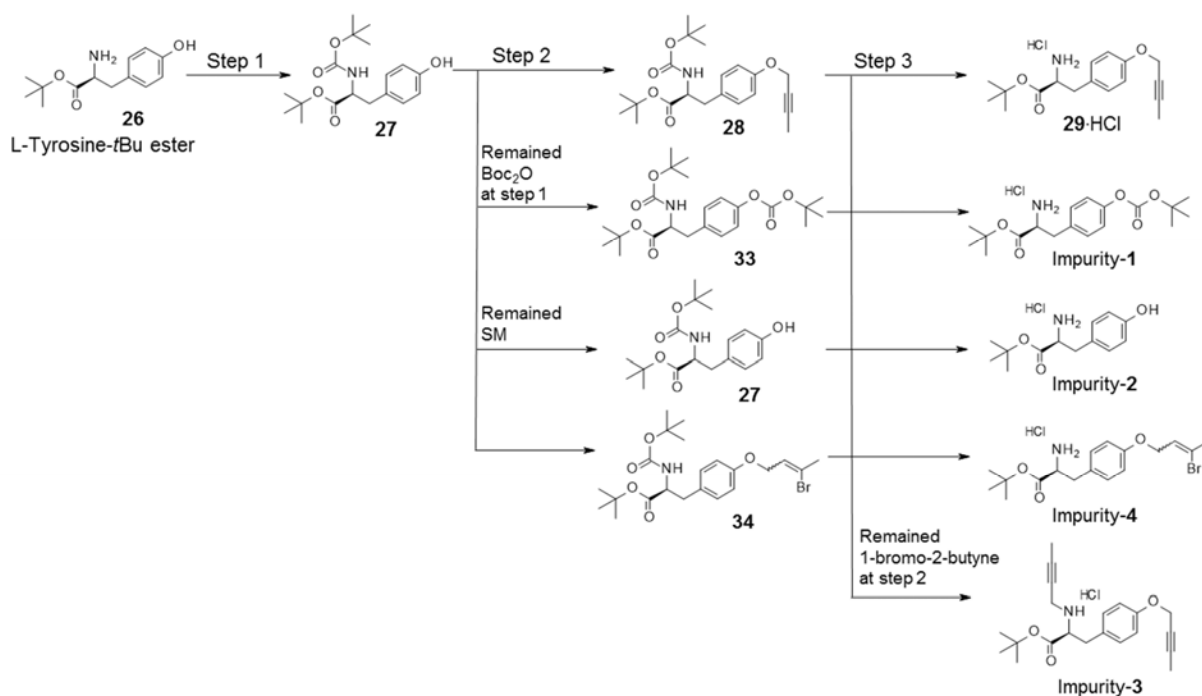
すなわち、製造プロセスの効率化に関しては濃縮、有機溶媒の乾燥、濾過、反応容器の洗浄、溶媒置換などの単位操作回数をできる限り抑えることで時間と資源を最小限に抑えるという考えに基づくものであり、安全面においては、環境、および設備への負荷の軽減、作業者の保護という観点である。

筆者らはこのような主に2つの方針に従い、工業化研究を進めることにした。

第3節 化合物 29 中に含まれる不純物解析と生成機構

まず、最初の取り出しポイントである化合物 29 の不純物解析を行った。試作製造にて得られた化合物 29 の不純物を分取 HPLC で単離、それぞれの不純物について NMR, MS スペクトルから構造を決定したところ、4 種の不純物 (Impurity-1~4) が同定された。

これら各々の生成機構を、各ステップの不純物推移も合わせて推定すると、Scheme 5 に示す生成過程が示唆された。



Scheme 6. 化合物 29 に含まれる不純物と生成機構

なお、impurity-1, 2, 4 は化合物 29 と同様の化学変換を受け、impurity-1, 2 は化合物 35 として、impurity-4 は化合物 36 として最終原薬に混入しうることがわかっている。よって、第1工程から第3工程の間において、これらの不純物を制御することが求められる。

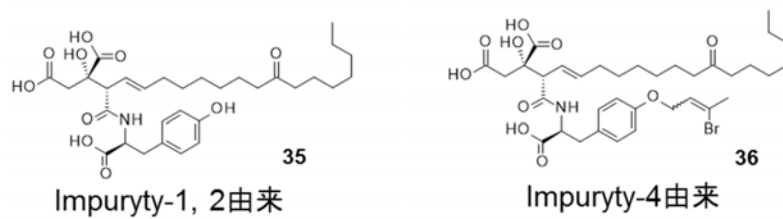


Figure 9. Impurity-1, 2, 4 由来で原薬に含まれる不純物

また、Impurity-3 は第 4 工程において化合物 **29** と同様の変換はほとんど受けないものの、試作製造時に多い場合には 8 % 以上副生した不純物であり、化合物 **29** の大きな収率低下につながった。よってこのものの制御も合わせて求められた。

第3章 製造に向けた製法改良（第1工程～第3工程）

第1節 第1工程の検討

1.1 製造プロセスの効率化

本工程では、製造効率の観点ではまず、初期ルートで行われていた晶析による目的物の単離取り出しをスキップすることとした。

その理由として、この反応は極めて選択的に進行し目的物のみを与えること、また実際の大量製造において晶析での取り出しを行うことは、濾過工程を必要とすることで製造時間もかかり、また関連設備の洗浄、洗浄確認など多くの労力を要することより、晶析取り出し工程を削減することはプロセス全体の効率を大きく向上させると考えられたからである。

また、製造効率の観点からさらに、反応溶媒をメタノールから DMF に変更し、第1工程と第2工程を同溶媒とするワンポット合成とした。このことで、第1工程においては反応進行率をチェックするのみで次工程への移行が可能となり、大幅な省力化に加え、製造期間の短縮も実現した。

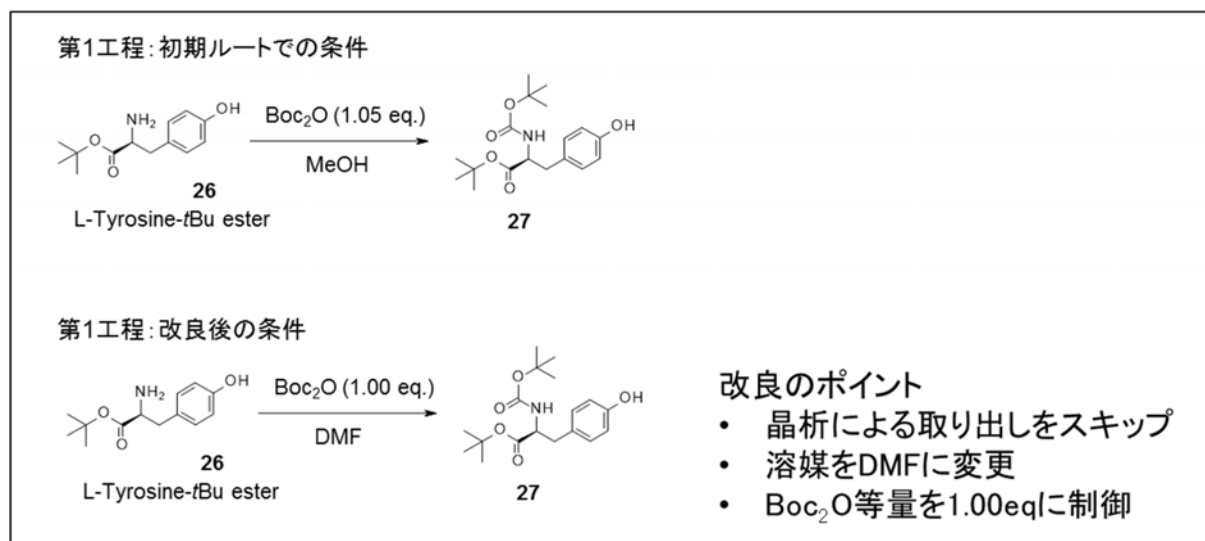
1.2 不純物制御

一方、不純物制御の観点からは、目的物の単離取り出しを行わないことに起因して不純物の生成が見られた。すなわち従来本工程では小過剰(1.05 等量)の Boc_2O を用いて反応を行っていたが、中性と考えられる第1工程条件では 0-Boc 化は進行しないものの、第2工程に持ち越された過剰分の Boc_2O は、第2工程の塩基性条件において Impurity-1 生成の原因となる 0-Boc 化を進行させてしまうことが判明した。

この副反応を抑制する手段として種々の方法を検討し、最終的には Boc₂O 当量を厳密に 1.00eq にコントロールすることで過剰の Boc₂O を次工程に持ち込まないようにし、これを抑制するプロセスとした。

この結果、6 Kg スケールの本製造においては、化合物 **29** 中の Impurity-1 を 0.05% (HPLC) までに抑制することができた。

以下に、第 1 工程における改良結果をまとめた。



第2節 第2工程の検討

2.1 製造プロセスの効率化

この工程においてはまず製造効率の観点で、反応後の抽出溶媒である酢酸エチル層の乾燥工程を、初期ルートで行われていた乾燥材を用いる抽出溶媒の乾燥および濾過工程を酢酸エチル溶媒留去による共沸脱水に変更できるかどうかラボでの実験を行った。後述するが、第3工程において水分含量が多い(1.4 w/w %以上)場合、脱 *t*-Bu エステル化が多く進行してしまうことがわかっており、本工程での有機溶媒中の水分制御は必須である。

比較実験を行った結果、第2工程後処理後 AcOEt 溶液を MgSO₄ 乾燥した場合の水分量 1.1% に対し、AcOEt による共沸脱水 (20 Torr, 外温 10 °C 以下) では 0.05% となり、共沸脱水がむしろより優れた脱水効果を認めたことより、MgSO₄ 乾燥を回避し共沸脱水を採用することとした。このことで、乾燥材の濾過工程を除くことができ、製造日程の短縮、設備洗浄の手間を省くことができた。

2.2 不純物制御

次に不純物制御の観点での検討結果を以下に述べる。

まず、反応釜を用いた予備的な試験製造において、本工程での反応転換率が未達のまま、反応進行が止まるというトラブルに見舞われた。

この工程における反応転換率が不十分である場合、化合物 **29** 中に impurity-2 が混入する要因となることが想定され、実際にラボスケールでの検討を行った結果、化合物 **29** 中に impurity-2 が混入した。よって安定してほぼ完全な反応転換率を実現する方法を確立することは、化合物 **29** の品質確保に必須であると考えられた。

ここで、反応未達の原因として考察すると、以下の原因が考えられた。

この反応は懸濁状態での攪拌であり、 K_2CO_3 は反応溶媒である DMF に溶解しきれておらず、すなわち heterogenous な反応となっている。

一方、目的の反応進行に伴って生成する KBr もまた DMF には溶解しないと考えられ、これが K_2CO_3 の表面を被覆することにより固体表面における塩基性を失い、反応速度が極端に低下するものと考えられた。ラボでの予備検討では攪拌子のすりつぶし効果で K_2CO_3 が固体表面に出続けることで反応遅延することはなかったものの、釜を用いた試験製造では攪拌翼での攪拌であることよりすりつぶし効果を得ることができず、反応遅延が発生したと考えられる。

この問題の根本的解決のため、より堅牢な、特に攪拌翼を想定した場合にでも反応転換率を高くできる反応条件の探索を行った。

まず、反応遅延要因の究明・改善に向け、(1) DMF 溶媒量、(2) 反応温度、(3) K_2CO_3 粒度の 3 点に着目して検討を実施した。検討結果を以下に示す。

Table 1. 第 2 工程：反応転換率向上に向けた検討

| Entry | DMF (v/w) | 温度 | K_2CO_3 *1 | 1 hr | 2 hr | 3 hr | 4 hr | 5 hr | 6 hr | 備考 |
|-------|-----------|-------|--------------|------|------|------|------|------|------|-------------|
| 1 | 4 | 18-34 | 通常品 4 eq. | 12.9 | - | 32.1 | 42.4 | 52.8 | 60.6 | 試験製造 (反応遅延) |
| 2 | 4 | 18-25 | 通常品 4 eq. | 7.9 | 16.4 | 22.8 | 29.2 | 35.9 | - | 遅延の再現 |
| 3 | 8.5 | 18-25 | 通常品 4 eq. | 7.3 | 12.9 | 17.5 | 21.6 | 28.1 | - | |
| 4 | 4 | 25 | 通常品 4 eq. | 16.5 | 27.6 | 33.4 | 38.4 | 42.7 | 46.9 | |
| 5 | 4 | 40 | 通常品 4 eq. | 65.0 | 74.7 | 77.4 | 80.3 | 82.0 | 83.4 | |
| 6 | 4 | 25 | 粉碎品 4 eq. | 99.4 | 99.7 | - | - | - | - | |

*1 通常品：高杉製薬 食品添加用，粉碎品：旭硝子 FG-R20

(1) DMF 溶媒量

反応遅延を生じた試験製造においては、操作の都合上 DMF 溶媒量を従来の8.5 v/w から 4 v/w に削減していた。溶媒量削減が反応転換率低下原因になるかを検証するため、DMF 8.5 v/w による反応を試みた (Entry 3)。その結果、むしろ若干の反応遅延を認めたことより、溶媒量は反応速度に影響を与えないと考えられる。

(2) 反応温度

反応遅延を生じた試験製造においては、反応による発熱を考慮し、反応初期温度を18 °Cと低く設定したこと (ラボ検討では25°C) が試験製造での遅延要因か検証するため、初期温度25 °Cで反応を実施した。(Entry 4)。その結果、ほぼ同等の反応速度となった。

一方、40 °Cで反応を試みた場合若干の反応速度向上は認められたが、通常4時間程度で反応が完結するのに対し、反応6時間で83.4% conversion となり、根本的な改善にはならなかった。(Entry 4)。

(3) K₂CO₃ 粒度

K₂CO₃ の比表面積を増大させることを目的に、K₂CO₃ 粉砕品 (旭硝子, FG-R20 : 個数平均粒径 20 μm、比表面積 1.9m²/g) を用いて反応を実施した (Entry 3 及び5の比較)。結果、顕著な反応速度の増加を認め、このことから K₂CO₃ 比表面積は反応進行させるための critical factor の一つであると考えられた。

そこで、K₂CO₃ 粉砕品使用によるスケールアップ検証実験を行った。

<反応条件>

スケール : L-チロシン-*tert*-ブチルエステル 100 g 仕込みスケールで第1工程を行い、その反応液を原料として用いた。

攪拌 : ファドラー翼

反応温度 : 25 °C

溶媒量 : DMF 4 v/w

K_2CO_3 : 4 eq. (粉碎品, 旭硝子, FG-R20)

1-bromo-2-butyne : 1.2 eq.

反応転換率の推移を以下に示す。

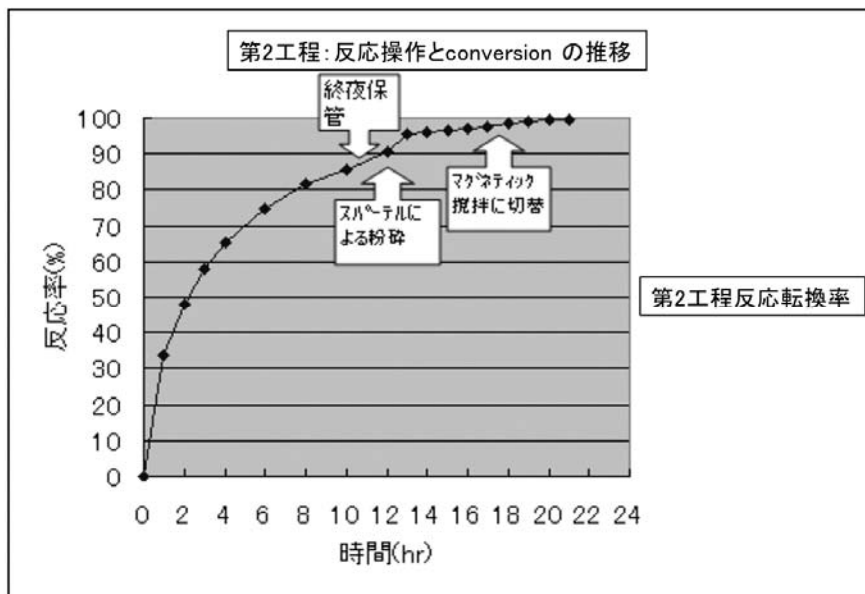


Figure 10 100g scale における反応転換率の推移

本実験では予想に反して粉碎品使用においても反応率は12 hにおいて90 %となり、反応遅延となった。この後、スパーテルによる反応懸濁液中の固体の破碎、攪拌形態の変更（ファドラー翼→マグネティックスターラー）を行い、物理的な破碎を行った結果、反応を追い込むことができた（反応率99.7 %）。

この実験より、 K_2CO_3 を粉碎品に改変するだけでは反応転換率に関して十分な堅牢性が担保されたとはいえず、実製造に適応させるためにはさらなる改良が求められたと同時に、やはり K_2CO_3 を固体表面に出し続けることが重要であることが分かった。

そこで、反応系内に水を添加することにより K_2CO_3 表面を被覆していると考えられる KBr を溶

解させて十分な塩基性を保つことで反応速度の向上に繋げることができるかを検証した。

ブチニル化反応前の Boc 化反応溶液中へ水を添加し、Karl Fischer 法による水分量 (%) とブチニル化反応率に相関がないか小スケール (600 mg スケール、室温で振盪攪拌) にて検討した結果、特に顕著な効果が見られ、良好な反応推移を示す至適水分領域 (1~2%) が存在することが判明した (Figure 11)。この水分領域においては反応 30 分の反応率が 99.4~99.8 % と良好で反応遅延が回避された。

一方、水分添加量が多くなりすぎた場合には逆に反応速度の低下が観察され、水分量を最適に調整することが重要であることも同時に明らかとなった。

また、添加した水の量と Karl Fischer 法による水分量 (%) には直線性を認め (Figure 12)、水添加による水分量コントロールは十分に可能な操作であると判断した。

そこで、フアドラー翼を用い、10 g スケールで反応を行った結果、反応 30 分の反応率が 99.7 % となり、反応が狙い通り遅延することなく進行することを確認できた。

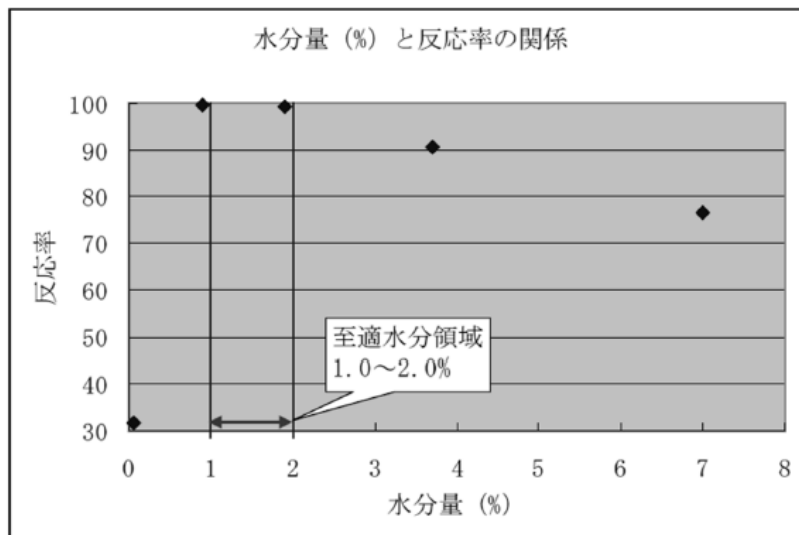


Figure 11 水分量 (%) と反応率の関係

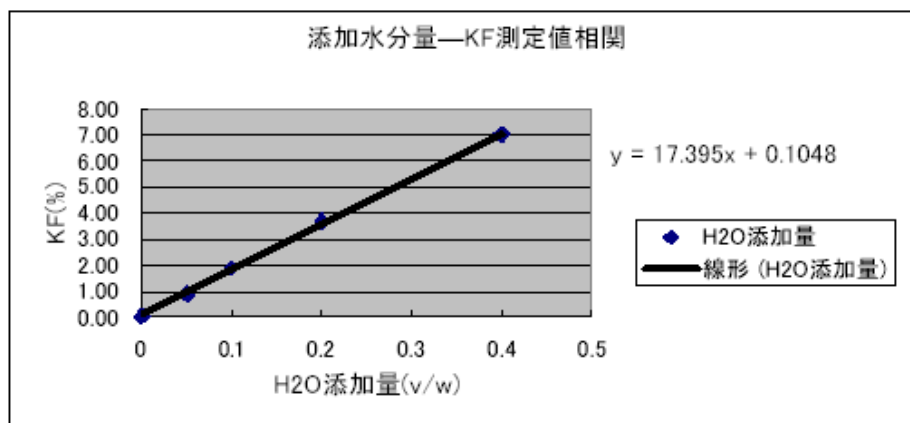


Figure 12 添加水分量—KF 測定値相関

実製造においては使用するを粉碎品に変更するとともに、系内水分量 1-2% という規格値を設定した。

上記検討結果は製造結果とあわせて下記 Table2 に示した。6 kg スケールでの実製造においては 1 時間で 99.9% 以上の反応転換率となり (Entry-6)、Impurity-2 の制御を達成することができた。

Table 2. 第 2 工程における水分量と反応転換率の関係

| Entry | Amount of additional water (v/w) | KF (%) | Conversion (%) at 30min. |
|-------|----------------------------------|--------|--------------------------|
| 1 | 0 | 0.07 | 31.7 |
| 2 | 0.05 | 0.9 | 99.8 |
| 3 | 0.1 | 1.9 | 99.4 |
| 4 | 0.2 | 3.7 | 90.5 |
| 5 | 0.4 | 7.0 | 76.6 |
| *6 | 0.055 | 1.0 | >99.9 |

反応条件： 室温にて30分振盪、600 mg scale. * 25 °C, 1 hr, at 6.00 kg scale manufacturing.

次に、Impurity-3 の制御方法検討について述べる。

過剰に用いる求電子試薬の 1-bromo-2-butyne が反応後に残存すると、第 3 工程において Impurity-3 の生成要因となり、化合物 29 の収率低下の一因となることが分かった。多い場合には化合物 29 中の Impurity-3 の生成は 8 %以上となり、大幅な収率低下を引き起こすとともに、化合物 29 の大きな純度低下の原因になった。

これを抑制するために、初期製造においては後処理で取得した有機層の濃縮を繰り返すことで 1-bromo-2-butyne も留去、残留量を設定規格値以下に制御することでこの副反応を抑制した。しかし、この方法で副生成物の抑制は達成できたものの、操作が煩雑、時間がかかることよりさらなる効率化を目指し改変を行った。すなわち、このアルキル化剤を何らかの方法により不活化し、そののちに系外に除去するという方法である。

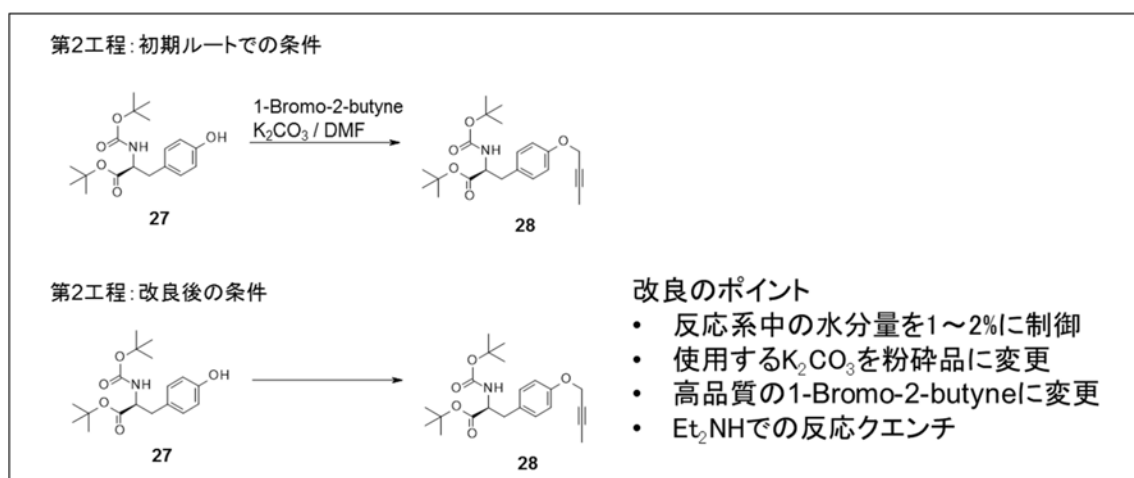
その結果、反応終了後の反応液にジエチルアミンを添加しこのアルキル化剤をクエンチ、液々分離によって洗浄除去する手法を確立した。この手法を用いて簡便に、かつ確実に 1-bromo-2-butyne を反応系内から除くことができ、当該不純物生成を抑制することができた。

さらに、Impurity-4 に対してもこの工程が原因であることが分かった。

検討初期に購入していた 1-bromo-2-butyne の品質を精査した結果、本試薬中に少量の 1,3-dibromo-2-butene が混入していることがわかり、これが Impurity-4 の生成原因となっていることが明らかとなった。

この問題解決のため試薬メーカーとの調整を行い、試薬調達時の 1,3-dibromo-2-butene 含有量の規格を厳密に設定することで高純度の試薬を調達できるようになり、実際の製造では Impurity-4 の生成量を 0.07 % (HPLC) に抑制することができた。

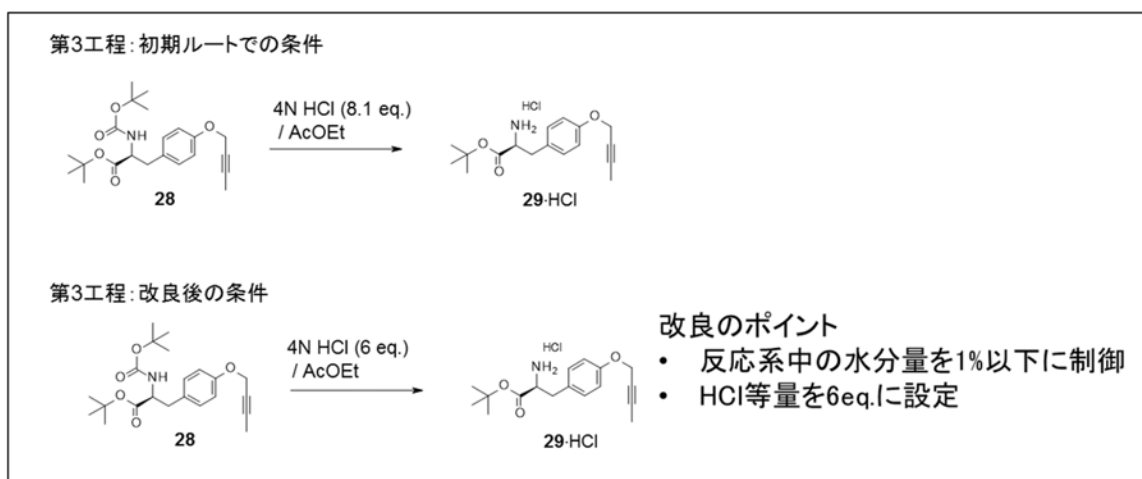
以下に第2工程における改良結果を示す。



第3節 第3工程の検討

本工程は、Boc 保護アミンと、*t*Bu エステルが共存する中でアミンの Boc 保護のみを酸性条件で脱保護するというデリケートな工程である。品質を担保するために各種反応パラメーターの検討を行った。

その結果、反応温度 25 °C の標準条件において、液中の水分量が 1.4 % より多い場合と、4N HCl/AcOEt の当量が 6.6 等量より多い場合、脱 *t*-Bu エステル化が進行することによる品質低下が確認されたことより、第 3 工程開始時に反応系内の水分を 1 % 以下にコントロールすること、また、反応に用いる塩酸の等量も 6 等量程度にコントロールすることが品質担保に重要であることを明らかにし、これを製造時の反応条件として設定した。



第4節 小括

このようにして高収率、高純度での中間体 **29**・塩酸塩の堅牢な合成法を開発した。

本合成法は実際の治験薬製造に適用され、HPLC 純度 99.8%、3 工程の通算収率 86%、7.08 kgの化合物 **29**・塩酸塩を取得することができた。

後述するが、このものを用いて続く第4工程から第8工程を行って得られた原薬中には、化合物 **29** に含まれる不純物由来不純物もすべて規格値以下に抑えることができた。

第4章 製造に向けた製法改良（第4工程～第8工程）

第1節 第4工程の検討

1. 1 反応効率性の改善

本工程では、まず生産性向上の観点で縮合に用いる試薬系を検討した。高価な HATU からより安価で、この反応においては同等の反応性を示したWSC-HOBt系に試薬変更を行った。

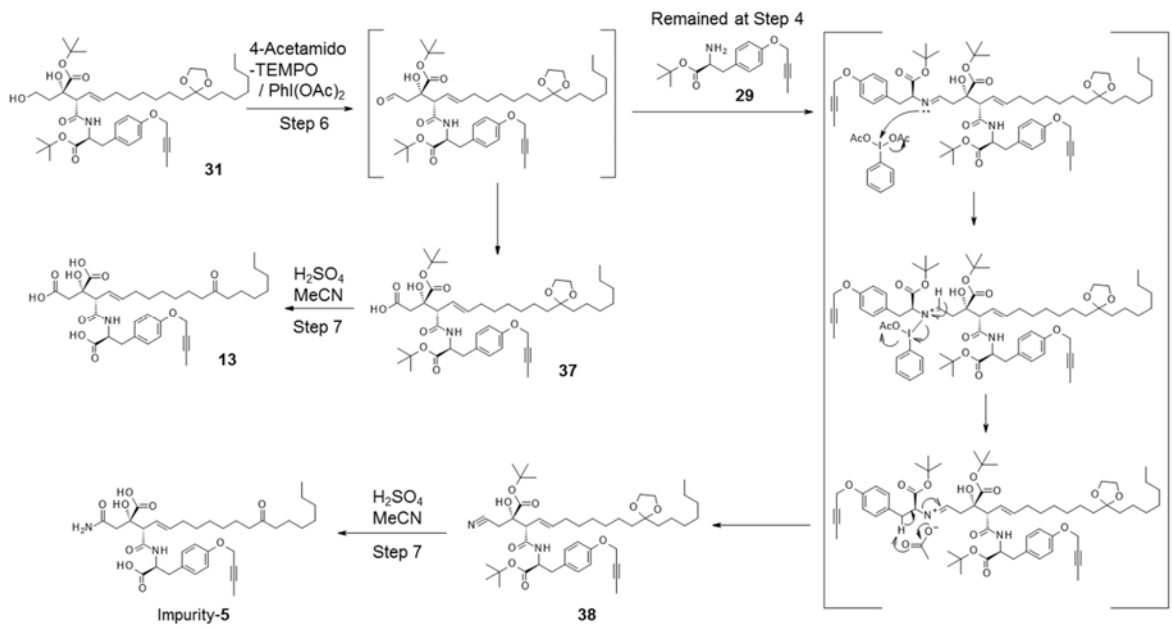
同時に反応溶媒をAcOEtとし、次の第5工程と溶媒を統一することで溶媒留去操作回避を達成した。

1. 2 不純物制御

また、品質面では、本工程が最終原薬中の不純物解析で見いだされたimpurity-5の生成過程に関連していることが明らかとなった。すなわち、impurity-5の生成過程を精査したところ、このimpurity-5生成量と、化合物**38**、さらには第4工程での残留化合物**29**の量の間に関係があることを見出すことができた。

このことから、この不純物生成機構として以下Scheme3に示す機構を想定した。

すなわち、化合物**31**がアルデヒドに酸化されたときに、第4工程で残留した1級アミンと反応し、 $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ と反応することにより**38**を生じ、その後の第7工程で水和反応を受け、アミド体であるimpurity-5を生じるというものである。Schemeを以下に示す。



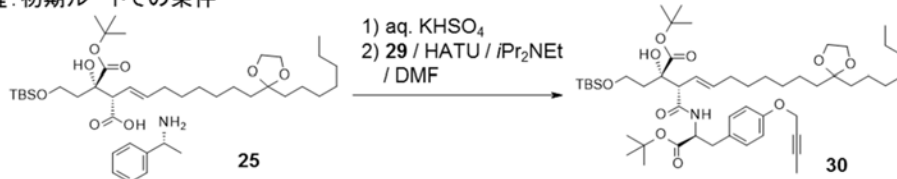
Scheme 7 想定される Impurity-5 の生成機構

上記仮説を検証するため、化合物 **29** を 5% 添加した化合物 **25** を原料として原薬まで導いたところ、有意に原薬中の Impurity-5 の増加がみられ、本仮説は確かなものと考えられた。

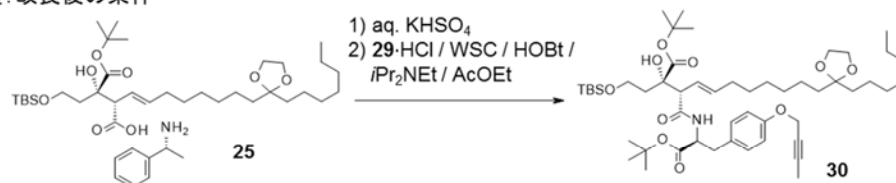
次に、この仮説に従いプロセス改良を行った。第 4 工程の後処理において化合物 **29** の除去を目的とするクエン酸酸性での洗浄工程を追加したところ、化合物 **29** の含有量を減少させることができ、その結果、最終原薬中の Impurity-5 を 0.07% (HPLC) に抑えることができた。

第4工程でのプロセス改良結果を以下にまとめる。

第4工程: 初期ルートでの条件



第4工程: 改良後の条件



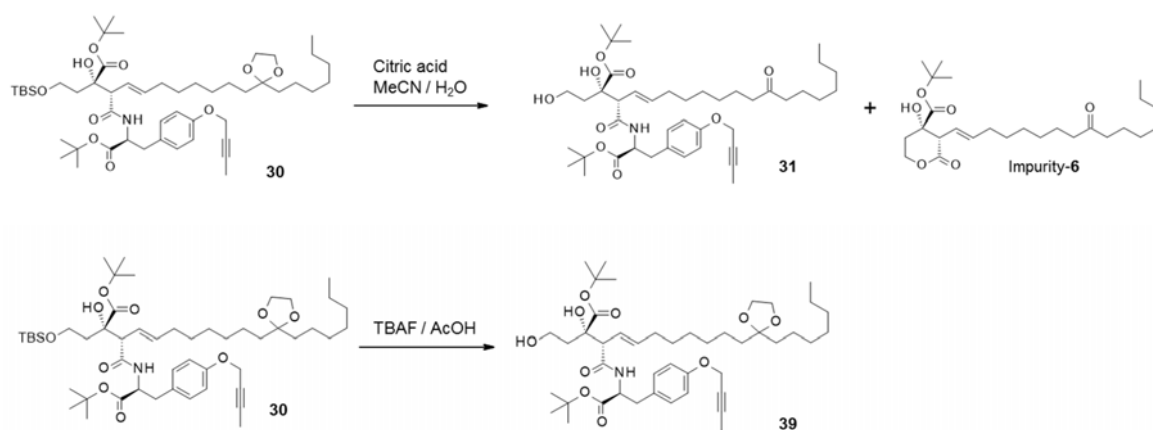
改良のポイント

- 安価なカップリング試薬への変更
- 酸性液々分離の追加による残留29の除去

第2節 第5工程の検討

本工程では、initial route 条件(citric acid, MeCN / water, 60deg., 2時間)では酸触媒による脱保護反応に伴いラクトン形成が進行し、約 5 %の Impurity-6 が形成されるということがわかっていました。

Impurity-6 は次工程での結晶化の際に母液側に除くことができることはわかっていたが、前述したとおり次工程での結晶化は行わない方針であることから、Impurity-6 が生成しない反応条件を探索することにした。



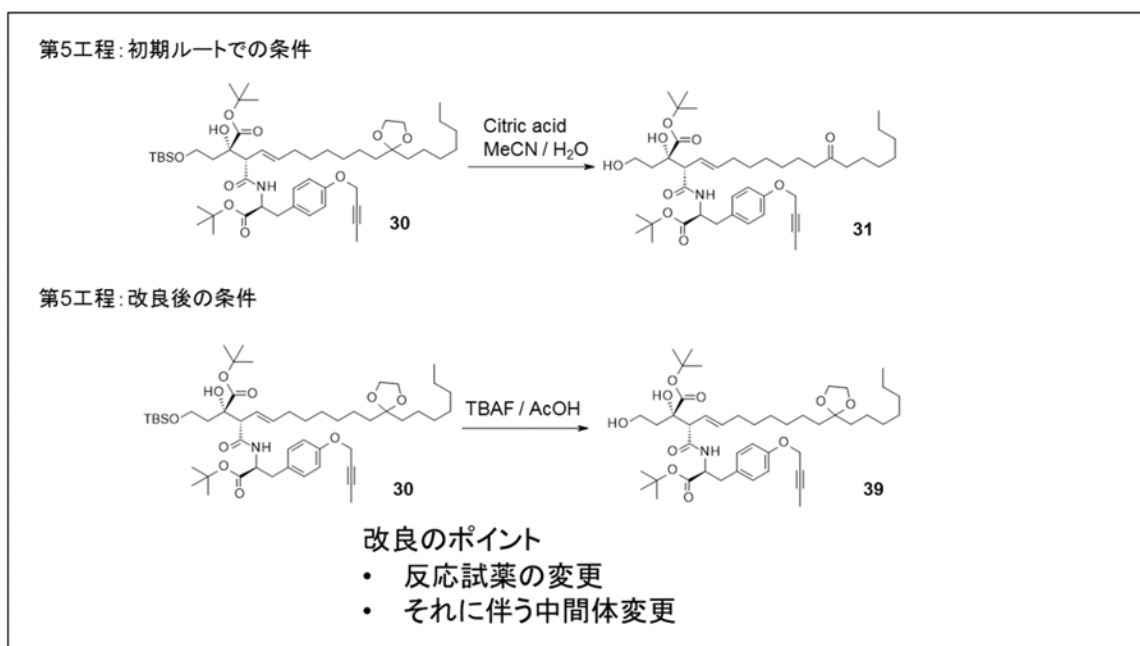
Scheme 8 Impurity-6 生成回避ルートの設定

酸性条件での脱シリル化ではこのラクトン環化反応を制御することは困難と考えられたことより、代替となる試薬を種々検討した。

その結果、TBAF / AcOH の条件ではこのラクトン環化は観測されなかったことより、こちらの条件を採用することとした。ただし、ケタール保護基は脱保護されず残ることより、試薬と同時に中間体も合わせて変更することにした。

この変更に伴い、原薬に導くために脱ケタール化の必要性が残ったが、第7工程の酸条件による de-*t*-Bu プロセスで同時に行うことができた。

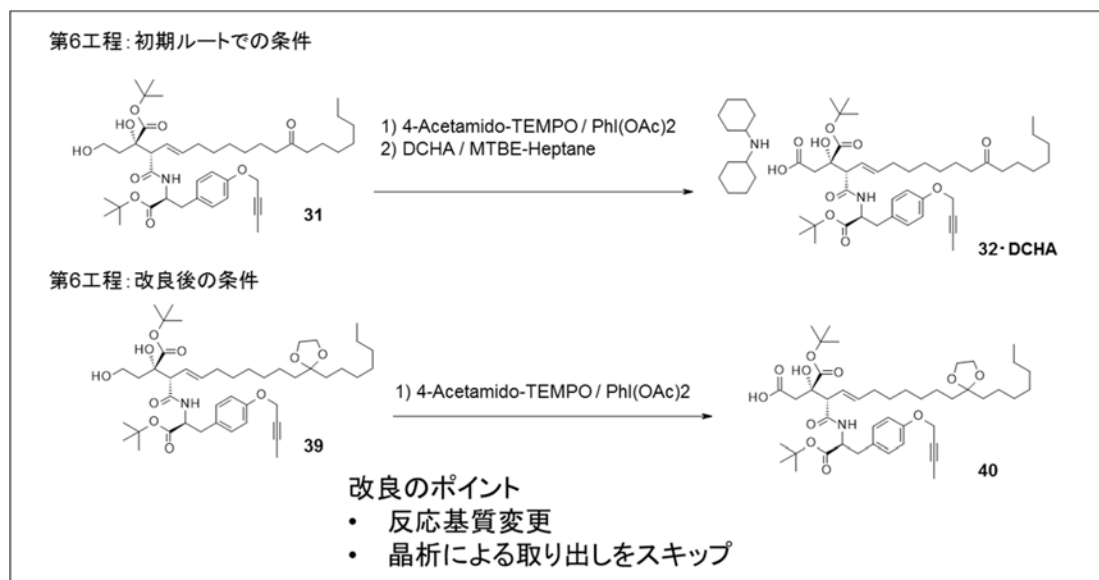
第5工程の改良結果を以下に示す。



第3節 第6工程の検討

本工程では、第5工程の条件変更により、反応基質自体が変更になっている。また、結晶化による生成は行わず、精製なしで次工程に用いるテレスコーピングを用いる方法へと変更がなされている。

ただし、反応条件に関しては $\text{PhI}(\text{OAc})_2$ 由来のヨードベンゼンの原薬中残留抑制を指向した AZADO²⁹⁾³⁰⁾ 等への酸化試薬変更や等量削減等検討は行われたものの、条件改良には至らず、基本的には初期ルートでの条件がそのまま用いられた。



第4節 第7工程の検討

4.1 反応条件変更

第7工程では、環境負荷を低減する目的で試薬を TFA / CH₂Cl₂から HCO₂H に変更して行われた。その後、この条件においては HCO₂H の融点は8°Cであり、濃縮時に冷却管の閉塞の懸念があった。腐食性による装置の負担も問題となり、それらを回避、低減するために、H₂SO₄ / MeCN に試薬変更が行われた。

4.2 実験計画法 (DOE : Design of experiments) を用いた反応条件設定

この条件での反応条件最適化には、DOE の手法を用いた。

DOE とは、プロセスを最適化したい場合に、どのような実験をするのが最も効果的であるかを計画し、また実験によって得られたデータをどのように解析して結果を予測していくかを導き出す手法である。

通常解決しなくてはならない問題がある場合、その問題を引き起こす要因はたいてい複数あり、そうした複数の要因の組み合わせを一つ一つ検証していくことは、かなりの労力を要する。例えば、あるプロセスに影響を与えている要因が3つある場合、どの要因がもっともプロセスに影響を与えているのかを調べるためには通常27通り (3×3×3) の実験をすることになるが、実験計画法では、最低9通りの実験で予測が可能となる。

よって、本手法を用いることで少ない反応数で効率的に反応条件設定ができるのではないかと考え、実際に検討を行った。

まず、予備的な検討より本工程においては ① H₂SO₄量、② 温度、③ 水分量 の3つのパラメーターが反応速度および不純物生成に影響を与えることが判明していた。

よって本検討では、反応3時間で反応率が>95% になるような使用 H₂SO₄量、温度、水分量の3つパラメーター設定を行うこととした。

パラメーター設定には、パラメーター間の相互作用も考慮した Design Space を作成した。

以下に DOE 実験の詳細を述べる。

4. 2. 1 設定範囲を広めにとった1回目の実験

【方法】

実験の条件設定には実験計画法を用いる。Design Space の設定のため、応答曲面計画を用い、実験条件の設定には中心複合計画を採用する。

まず1回目の実験では、各パラメーターの設定範囲はこれまでの検討から判断して、最適値を外さないように少し広めに設定した。

<Device & Conditions>

使用ソフト： JPM ver. 7. 0. 1

実験機器： ChemiStation PPS-5510

Test Tube (24mm x 200 mm)

Cooling Jacket: 0 °C

回転数： 800 RPM

Starting Material 780 mg, (Karl Fischer 法： 613 ppm)

H₂SO₄: 和光特級

<Calculation method>

Response Surface Design 応答曲面計画 (by Central Composite Design 中心複合計画)

設定範囲 (3 factors (因子) & 3 levels (水準))

中心点 2

H₂SO₄(v/w) = 0.1 から 0.5

H₂O (wt%) = 0.2 から 2.8

Temp. (°C) = 10 から 30

Table 3. 設定した3因子と3水準

| | Factor | | |
|-------|---|---------------------------|--------------|
| | H ₂ SO ₄ (v/w) | H ₂ O (w/w) | Temp (°C) |
| Level | 0.1 | 0.2 | 10 |
| | 0.3 | 1.5 | 20 |
| | 0.5 | 2.8 | 30 |

【結果】

以下に示す Table 4の条件に従い、16回の実験を行った。

それぞれの実験は3時間後の反応液をサンプリングし、反応率を HPLC での area 比にて計算した。

Table 4. 実験結果と Response

| Entry | H ₂ SO ₄ (v/w) | H ₂ O (w/w) | Temp.(°C) | Conversion (%) |
|-------|--------------------------------------|------------------------|-----------|----------------|
| 1 | 0.3 | 1.5 | 10 | 71.7 |
| 2 | 0.1 | 2.8 | 10 | 0.5 |
| 3 | 0.5 | 0.2 | 10 | 98.9 |
| 4 | 0.5 | 2.8 | 10 | 97.9 |
| 5 | 0.1 | 0.2 | 10 | 9.2 |
| 6 | 0.5 | 1.5 | 20 | 98.9 |
| 7 | 0.3 | 1.5 | 20 | 97.3 |
| 8 | 0.3 | 1.5 | 20 | 97.3 |
| 9 | 0.3 | 0.2 | 20 | 99.4 |
| 10 | 0.3 | 2.8 | 20 | 82.5 |
| 11 | 0.1 | 1.5 | 20 | 6.5 |
| 12 | 0.1 | 2.8 | 30 | 8.7 |
| 13 | 0.1 | 0.2 | 30 | 53.6 |
| 14 | 0.5 | 2.8 | 30 | 99.6 |
| 15 | 0.5 | 0.2 | 30 | 99.5 |
| 16 | 0.3 | 1.5 | 30 | 99.6 |

<Analysis>

JMP での解析結果を示す。

「予測値と実測値のプロット」にて示したように、今回の実験から得られた予測式はほぼ結果を反映し、また、その結果は有意であった。

<各パラメーターの効果の推定>

「パラメーター推定値」より、硫酸量と温度は正の効果、水分量は負の効果があり結果に影響していることが示された。またその影響度は 硫酸量>温度=水分量の順である。

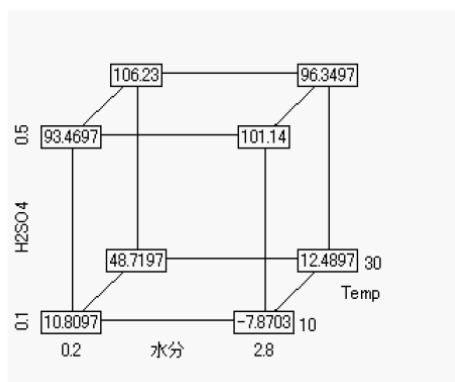
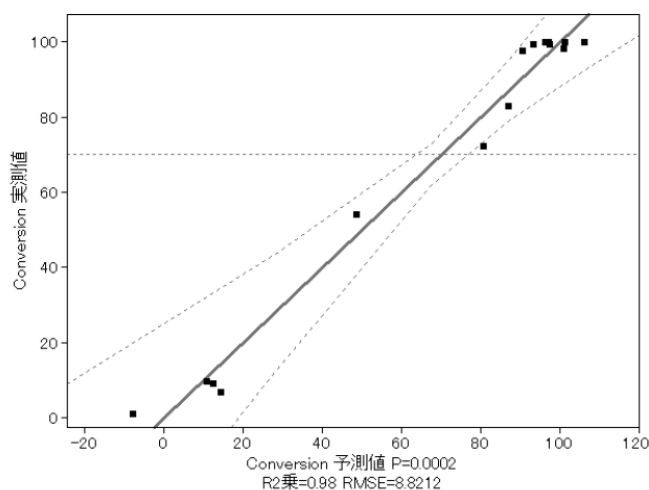


Figure 13. 予測値と実測値のプロット

予測値の反映に関して、決定係数 R^2 が $>95\%$ の場合に近似された式は結果を反映していると判断できる。今回の $R^2 = 98\%$ であり、近似された式はほぼ結果を反映しているといえる。

結果の有意性に関して、 P 値 < 0.05 の場合、実験結果は統計的に有意と判断できる。今回の P 値 $= 0.0002$ であり、結果は統計的に有意である。

<予測プロファイル>

Figure 14. に示す予測プロファイルでは、3つのパラメーター（① H_2SO_4 量、② 温度、③ 水分量）をそれぞれ変化させた時に、最も反応率が高くなる組み合わせを、満足度という指標で表すことができ、その時の各パラメーター値を示すことができる。Best condition の一例を以下に示す。

H_2SO_4 : 0.30 v/w, H_2O : 0.86 wt%, Temp.: 22.5 °C

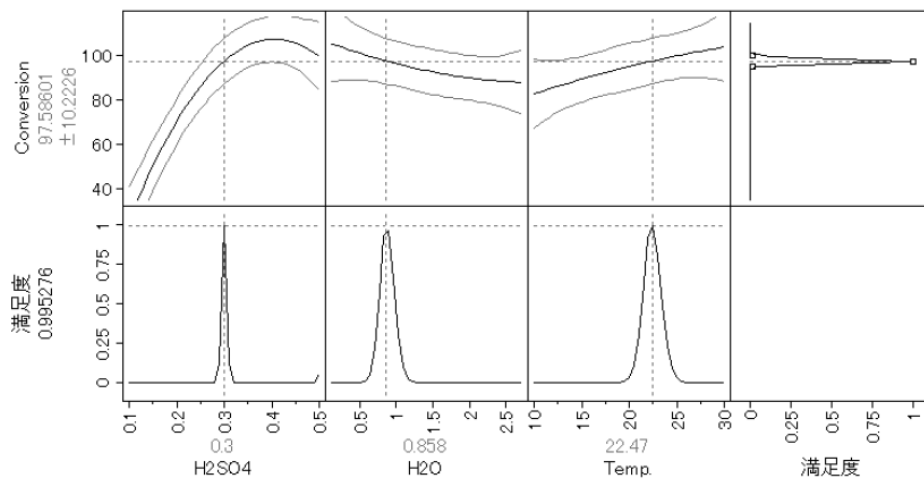


Figure 14. Best Condition の一例

効果 (Effect) の推定結果を以下 Figure 15 に示す。上から順に影響の大きいパラメーターが並ぶようになっており、その結果を解釈すると以下のように判断できる。

$H_2SO_4 \gg Temp. \approx H_2O$

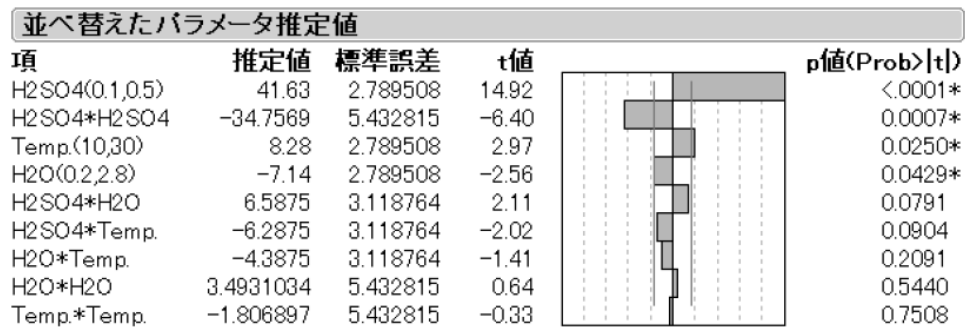


Figure 15. 各パラメーターの推定値

以上のように各パラメーターの有意性、影響度、およその結果の推定が出来たが、この実験では検討幅を広く取ったために予測値の誤差範囲が大きくなった (約±10%)。そのため、検討幅を縮小して再検討を行った。

4. 2. 2 パラメーター許容値再設定

【方法】

各パラメーターの設定は4. 2. 1での結果を反映し、下記のように範囲を絞って行った。

<Calculation method>

Response Surface Design 応答曲面計画 (by Central Composite Design 中心複合計画)

設定範囲 (3 factors (因子) & 3 levels (水準))

H₂SO₄(v/w) = 0.2 から 0.3

H₂O (wt%) = 0.5 から 1.5

Temp. (°C) = 20 から 30

Table 4. 設定した 3 因子と 3 水準

| Level | Factor | | |
|-------|--------------------------------|------------------|------|
| | H ₂ SO ₄ | H ₂ O | Temp |
| | (v/w) | (w/w) | (°C) |
| | 0.2 | 0.5 | 20 |
| 0.25 | 1.0 | 25 | |
| 0.30 | 1.5 | 30 | |

Table 5. 実験結果

| Entry | H ₂ SO ₄ (v/w) | H ₂ O (w/w) | Temp.(°C) | Conversion (%) |
|-------|--------------------------------------|------------------------|-----------|----------------|
| 1 | 0.25 | 1.0 | 20 | 94.4 |
| 2 | 0.2 | 1.5 | 20 | 61.4 |
| 3 | 0.3 | 1.5 | 20 | 97.7 |
| 4 | 0.2 | 0.5 | 20 | 86.0 |
| 5 | 0.3 | 0.5 | 20 | 99.4 |
| 6 | 0.25 | 1.0 | 25 | 98.6 |
| 7 | 0.25 | 1.0 | 25 | 98.6 |
| 8 | 0.25 | 0.5 | 25 | 99.4 |
| 9 | 0.25 | 1.5 | 25 | 96.2 |
| 10 | 0.3 | 1.0 | 25 | 99.6 |
| 11 | 0.2 | 1.0 | 25 | 87.9 |
| 12 | 0.2 | 0.5 | 30 | 98.2 |
| 13 | 0.25 | 1.0 | 30 | 99.5 |
| 14 | 0.3 | 0.5 | 30 | 99.6 |
| 15 | 0.3 | 1.5 | 30 | 99.7 |
| 16 | 0.2 | 1.5 | 30 | 90.8 |

<Analysis>

先の実験と同様に JMP にて結果の解析を行った。

得られた予測式は結果を反映しており、結果に有意性があることを確認した。

「効果の推定 (Figure 16)」より、硫酸量、温度、水分の各主効果とともに、硫酸量と温度、硫酸量と水分に相互作用が有意にあることが示された。特に、硫酸量と温度の相互作用は水分の主効果よりも大きいことがわかる。

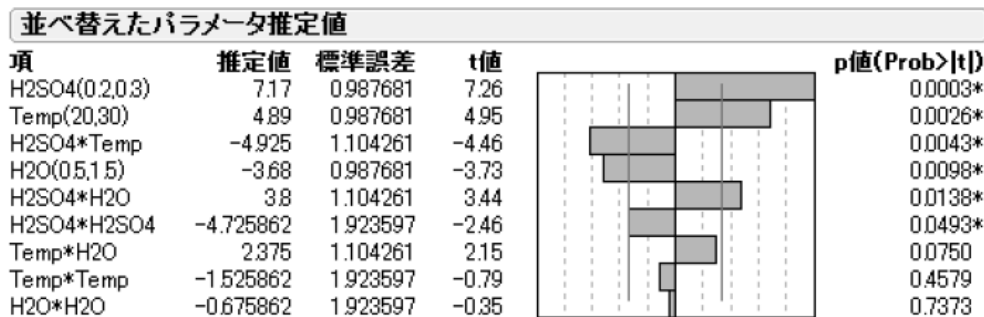


Figure 16. 各パラメーターの推定値

また、パラメーターの範囲を絞り込んだことで、予測式から得られる95%信用範囲は±5%以内になった。

予測値の反映に関して、決定係数 R^2 が >95% の場合に近似された式は結果を反映していると判断できる。今回の $R^2 = 96\%$ であり、近似された式はほぼ結果を反映しているといえる。

結果の有意性に関して、 P 値 < 0.05 の場合、実験結果は統計的に有意と判断できる。今回の P 値 = 0.0016 であり、結果は統計的に有意である (Figure 17)。

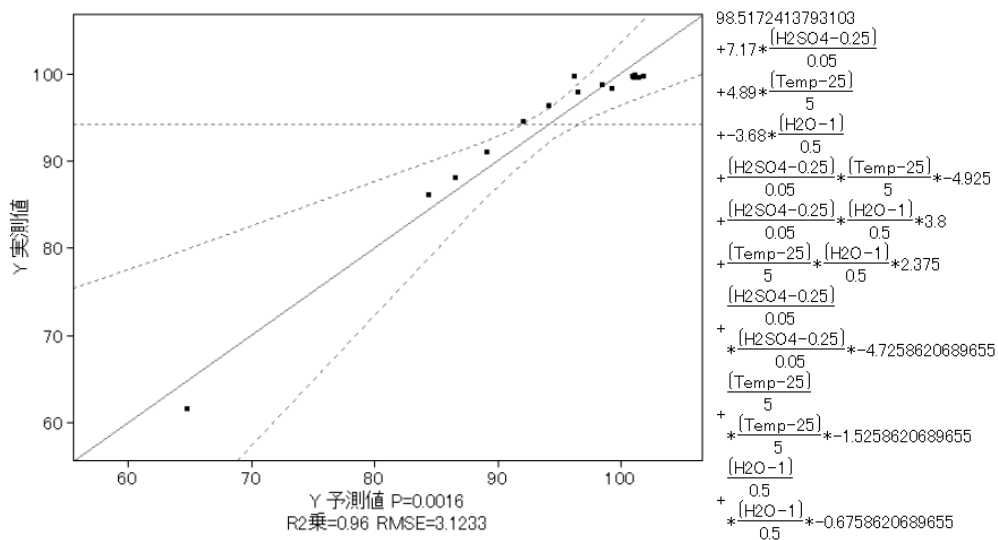


Figure 17. 予測値と実測値のプロット (左) と予測式 (右)

そこで、各パラメーターの Design Space 設定を行った。

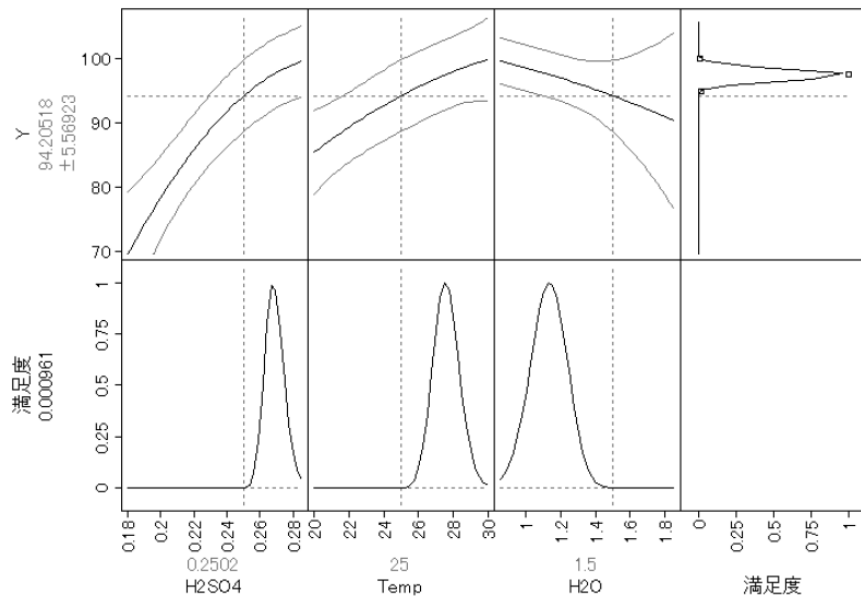
「予測プロファイル」より、反応率が95%以上となるように各パラメーター値を設定し、「等高線プロファイル(Figure 21)」にその許容範囲(Design Space)を示した。

その結果、各パラメーターの許容値は以下のように設定することが出来た。

$$H_2SO_4(v/w) = 0.23 \text{ to } 0.27$$

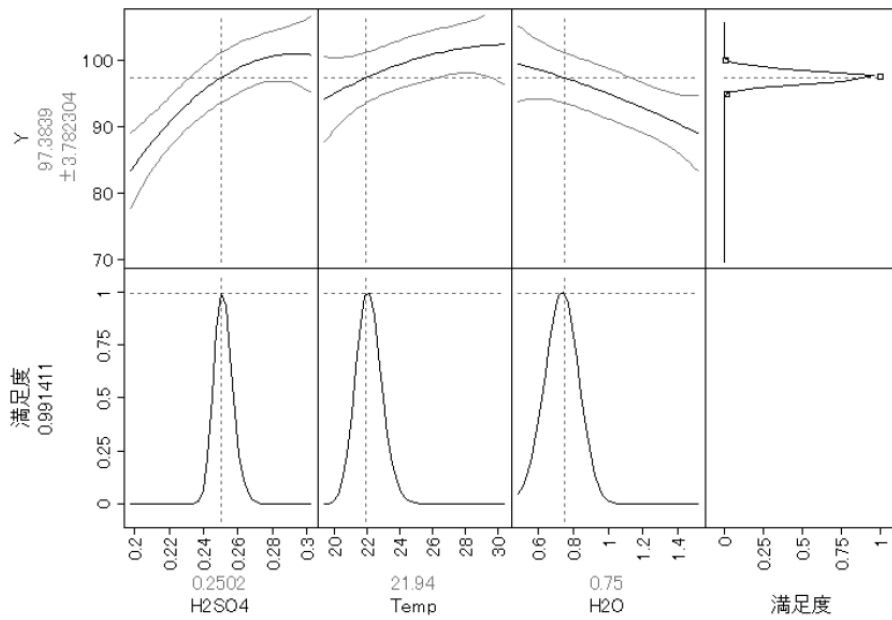
$$H_2O (wt\%) = 0.5 \text{ to } 1.0$$

$$Temp. (^\circ C) = 25 \text{ to } 30$$



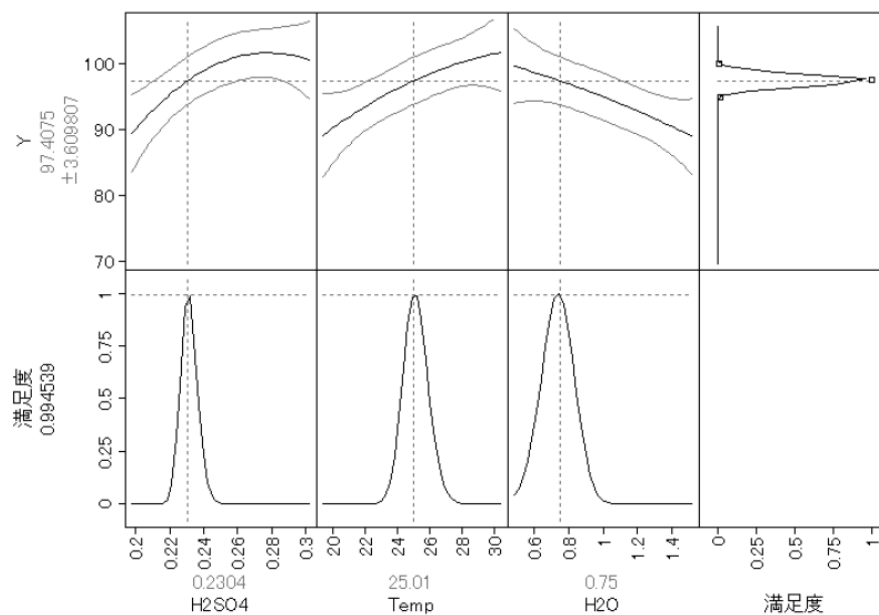
H₂SO₄: 0.25 v/w, H₂O: 1.5 wt%, Temp.: 25 °C

Figure 18. 検討前の条件 (Current Conditions)



H₂SO₄: 0.25 v/w, H₂O: 0.75 wt%, Temp.: 21.9 °C

Figure 19. Best Condition の一例 (その1)



H₂SO₄: 0.23 v/w, H₂O: 0.75 wt%, Temp.: 25 °C

Figure 20. Best Condition の一例 (その2)

次ページ以降に等高線プロファイル (Design Space)と交互作用プロファイルを示す。

等高線プロファイルにおいては、それぞれの白い部分が3時間における反応転換率95%以上のエリアを示しており、等高線がななめであること(すなわち並行又は垂直でないこと)が、縦軸と横軸のパラメーターに相互作用があるということを示している。

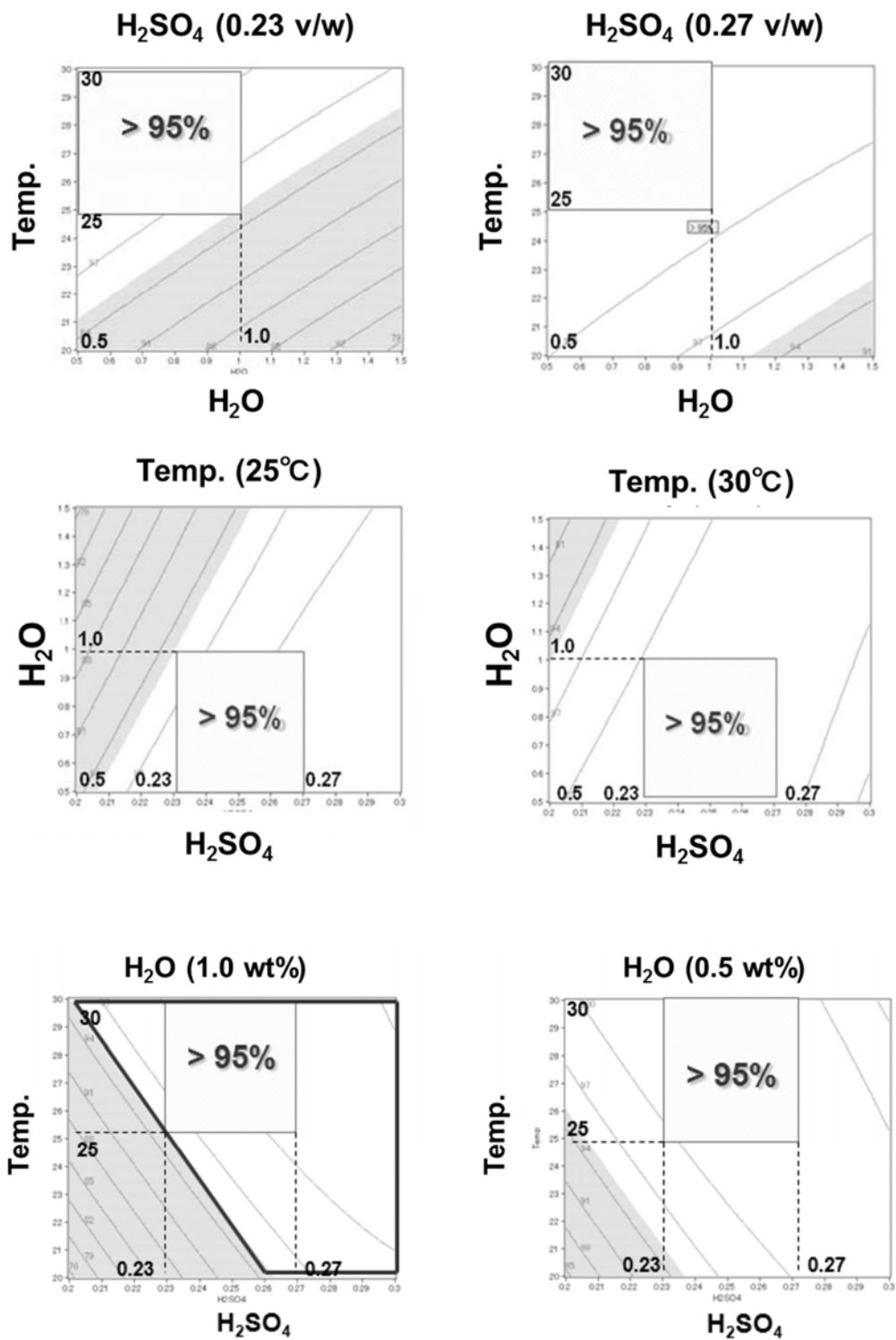


Figure 21. 等高線プロファイル (Design Space)

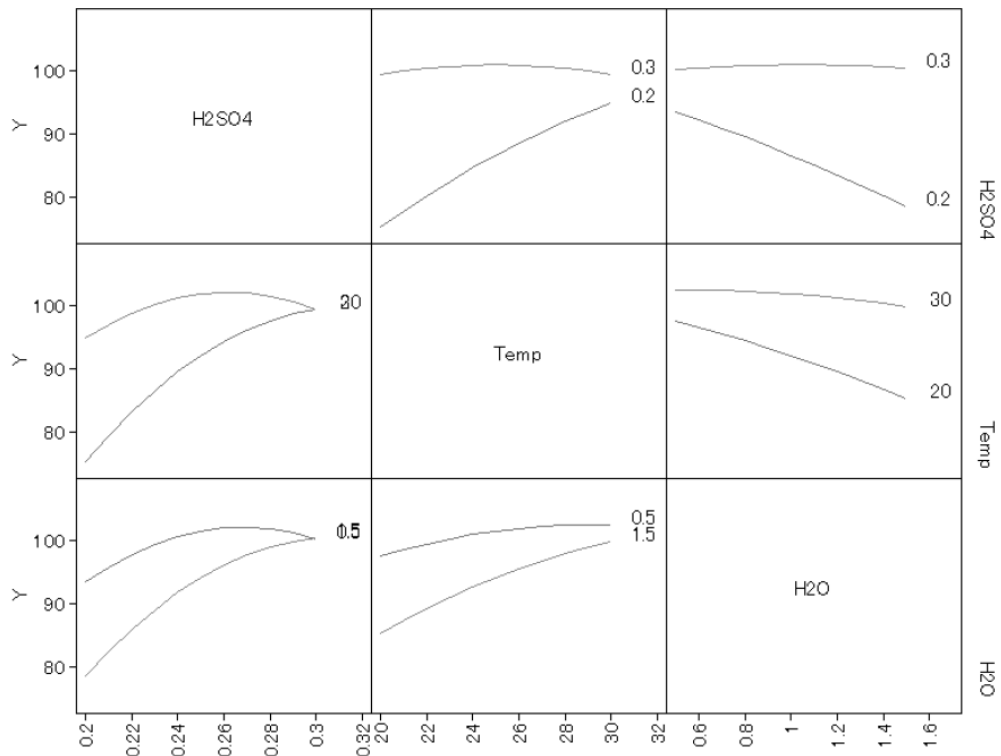


Figure 22. 交互作用プロファイル

以上のように、2段階にパラメーターの範囲を絞り込んでいくことで、精度の高い Design Space を設定することが出来た。また、その解析の中で、各パラメーターの主効果および相互作用の影響度の度合いを推定した。なお、この Design Space の設定では 3 時間後の反応率のみを応答としており、不純物プロファイルは考慮していない。

4. 2. 3 検証実験

最後に、許容値の確認を目的とし、設定した Design Space を基に実際に時間挙動を確認する実験を行ってその確かさを検証した。

結果を以下 Table 7, 8 に示す。

Table 7. H_2SO_4 0.25 v/w, H_2O 1.0 w/w 条件 : 4 温度での反応転換率

| Time (h) | Temperature (°C) | | | |
|----------|------------------|------|------|------|
| | 15 | 20 | 25 | 30 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 49.4 | 70.9 | 87.7 | 95.7 |
| 3 | 83.6 | 94.2 | 98.7 | 99.6 |
| 5 | 92.3 | 98.2 | 99.5 | 100 |
| 7 | 96.4 | 99.1 | 100 | 100 |

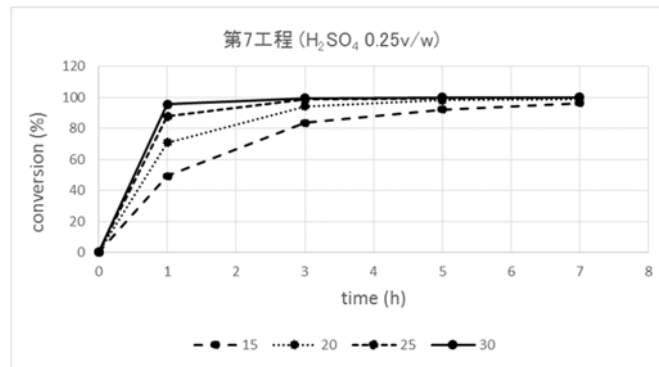


Table 8. H_2SO_4 0.20 v/w, H_2O 1.0 w/w : 4温度での反応転換率

| Time (h) | Temperature (°C) | | | |
|----------|------------------|------|------|------|
| | 15 | 20 | 25 | 30 |
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1 | 22.7 | 40.6 | 62.4 | 79.1 |
| 3 | 53.6 | 72.7 | 87.8 | 95.0 |
| 5 | 67.8 | 83.6 | 94.2 | 98.1 |
| 7 | 76.1 | 89.5 | 96.7 | 98.0 |

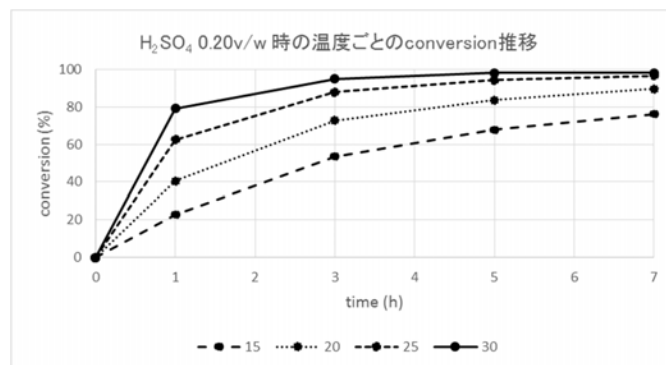


Table 7のように、硫酸量、水分値が Design Space の範囲内である場合には、3時間以内に温度が25 °Cでも反応率が >95 % となるが、Table 8のように硫酸量を設定の範囲外とすると、予測通り、温度が下限の25 °Cの場合に3時間後の反応率が <95%となった。

4. 2. 4 予測値と実測値の比較

次に、Table 7,8 それぞれの条件での実験結果（反応 3 時間での実測値）を、予測式から導き出した推定値と比較した。

結果は以下 Table 9 に示す通りであった。反応率が70 %以上の場合の予測精度は非常に高く、予測式はほぼ正確な結果を導き出していると判断できた。

Table 9. 実験結果：反応3時間後の反応転換率

| Entry | Temp.(°C) | H ₂ SO ₄ (v/w) | H ₂ O (w/w) | Conversion (%) | | Error ratio (%) |
|-------|-----------|---|---------------------------|----------------|--------|--------------------|
| | | | | Predicted | Actual | |
| 1 | 15 | 0.25 | 1.0 | 82.6 | 83.6 | 1.2 |
| 2 | 20 | 0.25 | 1.0 | 92.1 | 94.2 | 2.3 |
| 3 | 25 | 0.25 | 1.0 | 98.5 | 98.7 | 0.2 |
| 4 | 30 | 0.25 | 1.0 | 100 | 99.6 | -0.4 |
| 5 | 15 | 0.20 | 1.0 | 60.9 | 53.6 | -12.0 |
| 6 | 20 | 0.20 | 1.0 | 75.3 | 72.7 | -3.5 |
| 7 | 25 | 0.20 | 1.0 | 86.6 | 87.8 | 1.4 |
| 8 | 30 | 0.20 | 1.0 | 94.9 | 95.0 | 0.1 |

以上の結果から、反応率規格を95 %以上とした場合の各パラメーターの許容値は以下となった。

$$\text{H}_2\text{SO}_4(\text{v/w}) = 0.23 \text{ to } 0.27$$

$$\text{H}_2\text{O} (\text{wt}\%) = 0.5 \text{ to } 1.0$$

$$\text{Temp. (}^\circ\text{C)} = 25 \text{ to } 30$$

しかしながら、上記には不純物プロファイルへの影響は反映されていない。これまでの検討

で、H₂O が少ない場合、化合物40から impurity-5への加水分解速度が速く、ジアミド体生成リスクが高まる点、低極性側に新規不純物が生成することから、H₂O (wt%) =0.5 to 1.5 wt% (target 1.0 wt%) を採用した。

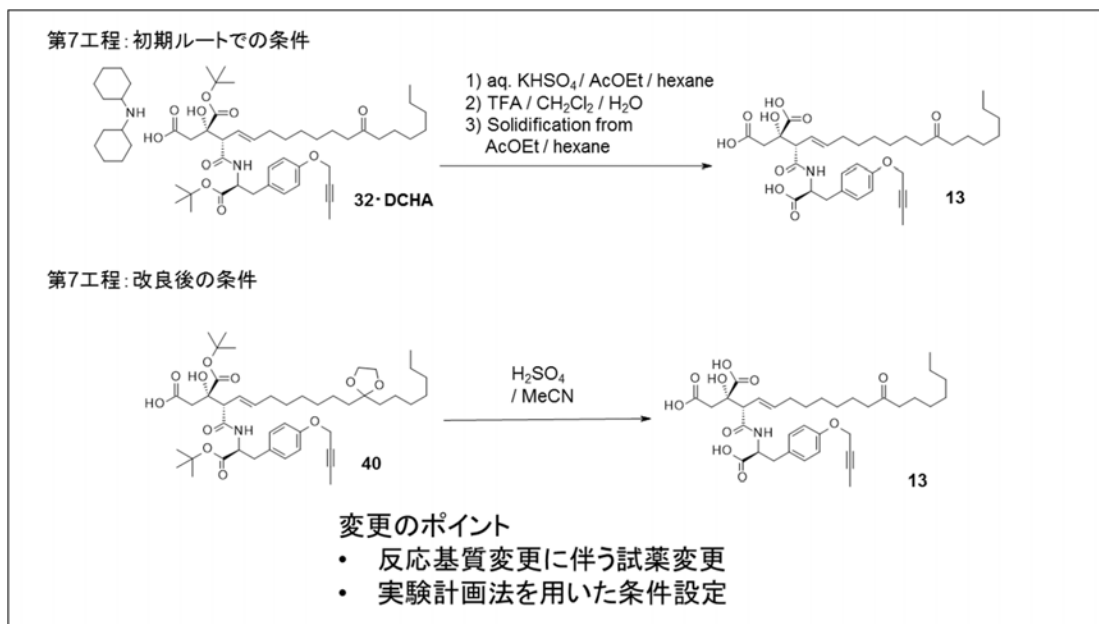
一方、硫酸添加時に発熱があることから、製造では硫酸を15℃で添加し、その後昇温する予定である。反応は硫酸添加と同時に進行することから、Temp. (°C) =15 to 30 °C (target 25°C) を採用した。

硫酸量については、上記許容値を反映し、H₂SO₄(v/w) = 0.25±0.02 v/w (target 0.25v/w) を採用した。

上記 target 値は Table 9における Entry3の条件であり、今回の実験で設定した Design Space の範囲内であることから、設定値として問題ないと考えられた。

このようにして、本工程においてはDOEの手法を用いることで効率的にパラメーター設定を行うことができた。

第7工程での検討結果を以下にまとめる。



第5節 第8工程の検討

5.1 晶析検討

3つのカルボキシル基を有するCH4630808は、初期ルートではフリー体での供給を想定して合成されていたが、臨床開発に先駆けて社内前臨床部門よりCH4630808の塩結晶形は、1.5Na塩、2.5H₂OのB型結晶とすることが決定された。

そこで、第8工程では第7工程で得られたフリー体の溶液に水酸化ナトリウム水溶液を加えてpH制御し結晶を析出させる、いわゆる反応晶析での取り出しをメインに検討することにした。

さらに原薬品質担保の観点でも種々検討を行い、最終的には晶析操作を2回繰り返し行う晶析方法を確立した。

すなわち、一度目の晶析は収量を重視した粗精製である。この晶析では適切なpHと塩濃度が収率に影響することを明らかにした。結果を以下に示す。

NaCl濃度が高くなるほど収量が向上し（左グラフ）、pH 5.1付近で収量は最大となった（右グラフ）。

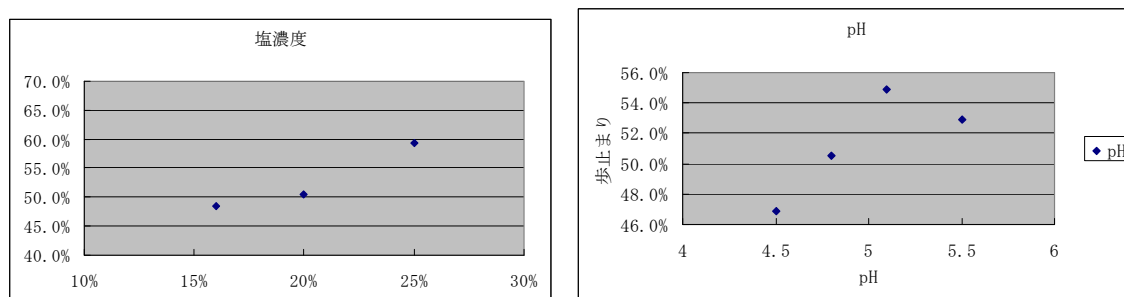


Figure 25. 晶析液中の塩濃度、pHと収量の関係

一方、2回目の晶析は品質を高めることを重視した設定とした。すなわち一度 pH>13 のインキュベートを経ることで、加水分解される構造と推定される低極性不純物群を母液側に除くというステップも組み込んでいる。

この2回の晶析の組み合わせで堅牢性の高い高純度原薬取得方法を確立した。

5. 2 最終原薬の結晶形の制御

初期の試作製造において目的とする結晶形でない A 型結晶が取得された。

これは予備検討では出現していなかった結晶形であった。これに関しても安定的に B 型結晶を取得するため、溶媒中の水分比率と晶析温度に着目しスラリーコンバージョン検討を行った。

結果を以下テーブルに示す。

Table 9. 結晶形制御スクリーニング

| Entry | Solvent (5v /w) | Conditions | Form A : Form B |
|-------|---------------------------------|---|-----------------|
| 1 | MeCN only | 25 deg., 1h | 76 : 24 |
| 2 | MeCN : H ₂ O = 8 : 2 | 25 deg., 1h | 49 : 51 |
| 3 | MeCN : H ₂ O = 8 : 2 | 35 deg., 1h | 14 : 86 |
| 4 | MeCN : H ₂ O = 8 : 2 | 35 deg., 2h | 0 : 100 |
| 5 | MeCN : H ₂ O = 8 : 2 | 35 deg., 2h then 25deg, 1h | 0 : 100 |
| 6 | MeCN : H ₂ O = 8 : 2 | 35 deg., 2h then 25deg, 1h then 10deg., 1h then 0 deg., 1h | 17 : 83 |
| 7 | MeCN : H ₂ O = 9 : 1 | 35 deg., 1h | 44 : 56 |
| 8 | MeCN : H ₂ O = 9 : 1 | 35 deg., 2h | 31 : 69 |

Form A : Form B = 79 : 21 の原料を用いた。

まず、溶媒中の水分比率に関して、水分量を多くすることでB型結晶比率が高まることが分かった。(Entry-1, 2) 次に、晶析温度を 25 °Cから 35 °Cに変更するとB型結晶比率が高まり、この条件においては2時間後にすべてB型結晶に収束することを明らかにした。(Entry-3, 4) また、Entry-4の温度を下げることで再度A型結晶が観察されるようになる(Entry-6)という結果を合わせて得ることができ、基本的な性質を理解することができた。それ以降の晶析条件設定においてもこの基本的性質を条件設定に反映させることにより、最終的には安定的にB型結晶を得ることができるようになった。

両結晶形の粉末X線結晶回折チャートを以下に示す。

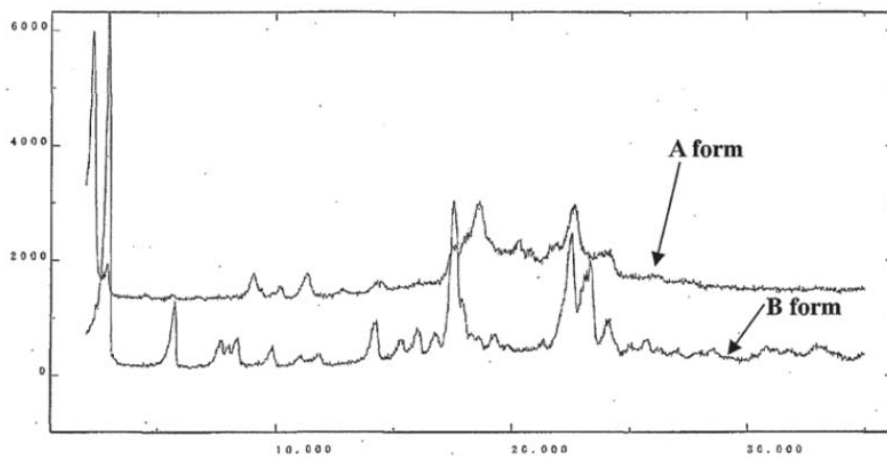


Figure 26 : CH4630808 の粉末 X 線結晶回折パターン

5. 3 最終原薬の結晶水の制御

原薬は 2.5 水和物での供給が必要であった。

乾燥条件を設定するにあたり、B 型結晶の等温吸着曲線を参考にした。以下に等温吸着曲線を示す。

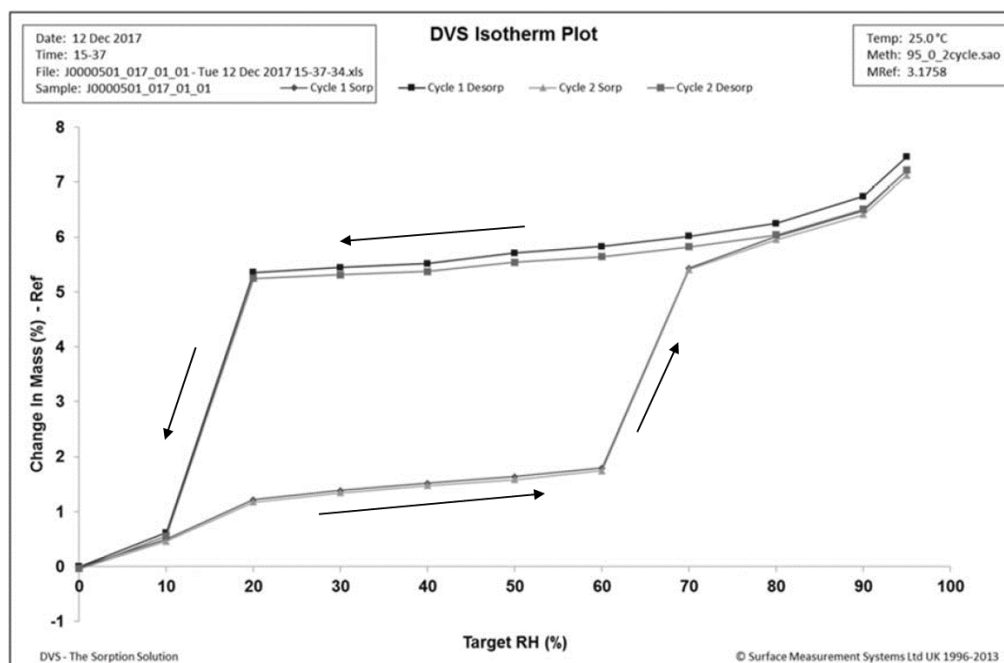


Figure 27. CH 4630808 の等温吸着曲線

この等温吸着曲線から読み取れることは、無水物を等温条件で加湿していくと 70% RH (relative humidity)にて 2.5 水和物となり、一方 2.5 水和物は等温条件で湿度を下げていくと 20% RH より低い湿度で結晶水を失い、無水物となるということである。

今回用いる晶析条件は含水系であることより、乾燥前の状態は 2.5 水和物であることが予想され、その結晶水を失わないように付着水を除去する必要があると考えられた。

よって湿度をコントロールしない通常の乾燥条件ではなく、調湿乾燥条件（ $50 \pm 20\%$ RH、 $30\text{ }^\circ\text{C}$ ）を設定し、実際の治験薬製造に用いたところ、結晶水を失うことなく付着水を除去することに成功し、原薬の結晶形、結晶水を望み通りにコントロールすることができた。

以下に第 8 工程の具体的な操作を示す。

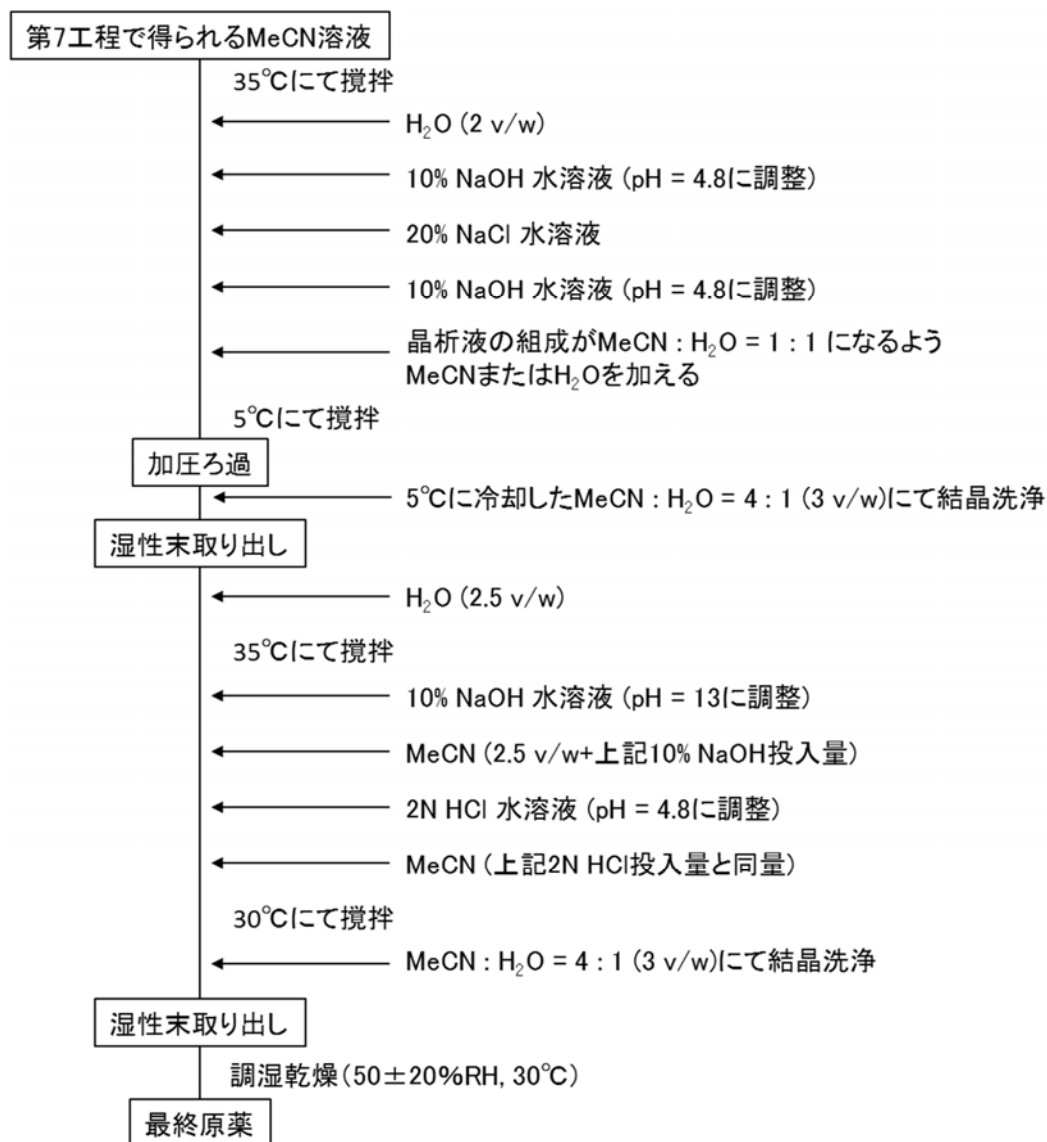


Figure 28. 第8工程の操作

第6節 小括

以上述べてきた改良を生かし、治験用原薬製造法として以下ルートを確立した。スループロセスを多用する方針の下、生産性向上を実現しつつ、高い堅牢性で原薬品質を担保できる Improved ルートを確立した。

まず、主に生産性改善の観点での改良結果を以下に示す。

Table 10. Improvement Summary

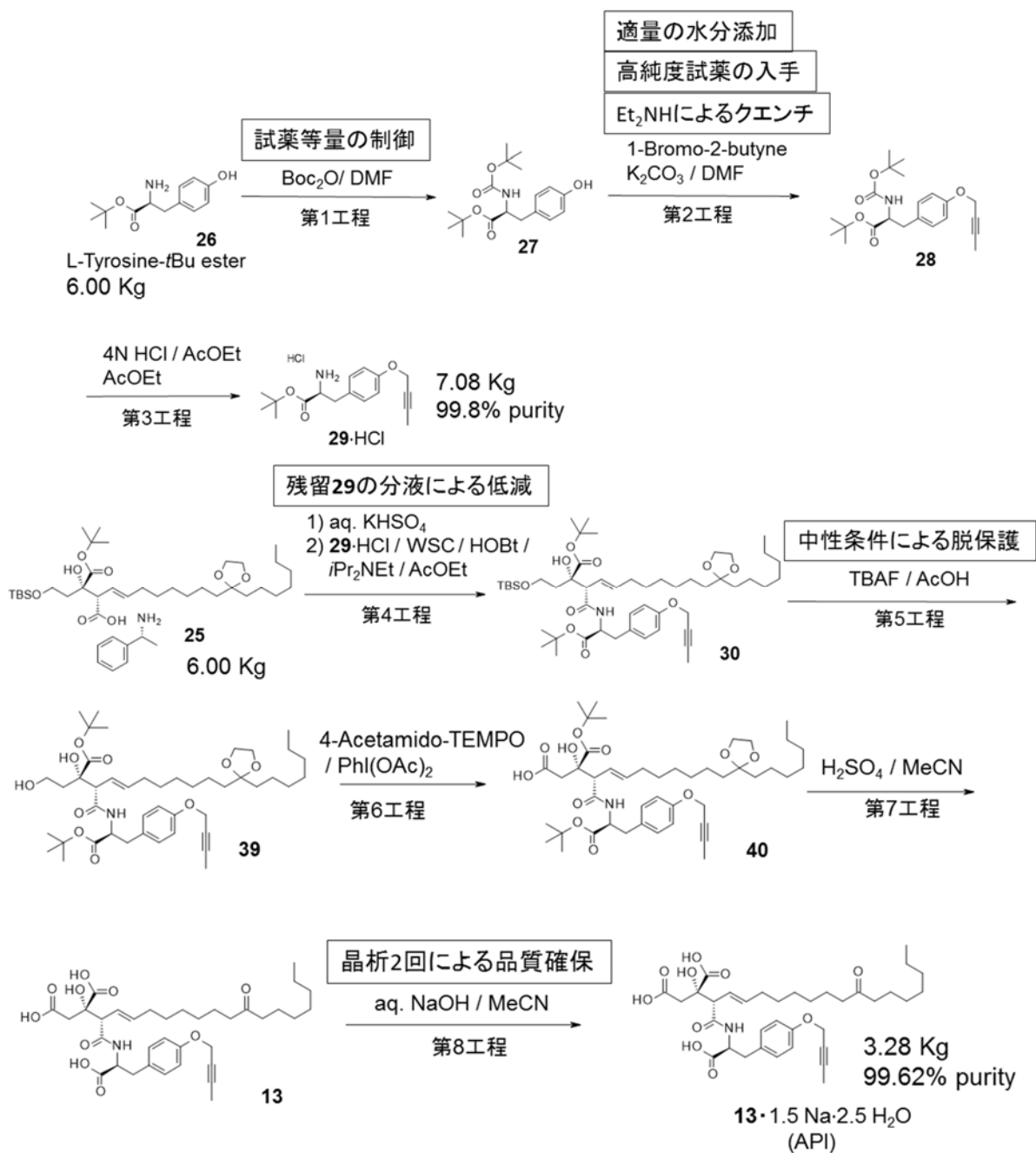
| | Initial Route | Improved route |
|--|---------------|--------------------|
| Total steps | 7 | 8 |
| Intermediate Isolation | 4 | 2 |
| Total organic solvent (v/w) | 457 | 74 |
| Kind of organic solvent | 8 | 4 |
| Filtration | 12 | 3 |
| concentration | 9 | 5 |
| Vessel washing | 24 | 7 |
| Total yield of 29 ·HCl (from 26 , %) | 82 | 86 |
| Purity of 29 ·HCl (HPLC %) | 99.0 | 99.8 |
| Total yield of 13 (from 25 , %) | 56 | 55 ^a |
| Purity of 13 (HPLC %) | 98.52 | 99.62 ^b |

^aTotal yield of API (**13**·1.5Na·2.5 H₂O), ^bpurity of API.

総工程数は最終物の Na 塩化工程が増えて通算8工程になっているにもかかわらず、総収率は Initial route とほぼ変わらず55 %となった。また、生産性の観点では、使用した有機溶媒量、濾過の回数、濃縮の回数、反応釜の洗浄回数を大幅に少なくすることができ、作業者の労力、作業日数、環境負荷を著しく改善させることができた。

また最も困難と思われた課題である、中間体単離回数の削減と原薬品質向上の両立に関しては、単離回数が4回から2回になったにもかかわらず、最終原薬の品質は98.52 %から99.62 %と向上しており、この課題も達成することができた。

品質担保の観点での検討結果を次に Scheme として示す。



Scheme 9. プロセス改良まとめ

不純物単離、構造決定からの生成機構考察を基盤とするプロセス変更を行い、上記に示す通りの改良を行い高品質原薬供給可能な製法を確立することができた。

最後に、この製造は第 II 相治験薬に用いる原薬製造であり、GMP (Good manufacturing practice) 管理下で行われた。すなわち、予め設定された製造手順に従い実施し、予め設定された品質規格に適合する治験薬を得ること求められた。

以下に GMP 製造の観点からの結果を示す。特に、不純物に関してはすべての不純物に関して規格値以下であり、かつ最大のもので 0.08 % と、すべて 0.15 % を下回る結果となっている。

Table 11. 原薬製造結果 (収量, 収率, 工程・品質試験結果)

| 項目 | 規格 | 結果 |
|--------------|--------------------|---|
| 収量 | 標準出来高 2.0~4.0 kg | 3.28 kg |
| 収率*1 | 35~70% | 55% |
| 残留溶媒：酢酸エチル | ≤4500 ppm | ND |
| 残留溶媒：アセトニトリル | ≤369 ppm | ND |
| 結晶形 | B型 | B型 |
| 純度試験 | RRT 0.53 : 1.2% 以下 | RRT 0.53 : 0.04% |
| | RRT 0.92 : 0.2% 以下 | RRT 0.53 : 0.07% |
| | RRT 0.99 : 0.3% 以下 | RRT 0.53 : ND |
| | RRT 1.14 : 0.2% 以下 | RRT 0.53 : ND |
| | RRT 1.57 : 1.5% 以下 | RRT 0.53 : ND |
| | RRT 1.76 : 0.2% 以下 | RRT 0.53 : ND |
| | RRT 2.03 : 0.3% 以下 | RRT 0.53 : 0.07% |
| | RRT 2.08 : 0.4% 以下 | RRT 0.53 : 0.03% |
| | RRT 2.13 : 0.2% 以下 | RRT 0.53 : ND |
| | | その他の個々の類縁物質量 : 0.15% 以下 総類縁物質量 : 4.5% 以下 |
| Naイオン含量 | 5.0~7.0% | 6.0% |
| 原薬含量 | 75~90% | 86.6% |
| 性状 | 白色~薄い黄赤色の粉末 | 白色の粉末 |

*1 第 4 工程から第 8 工程までの通算収率 *2 検出限界以下

*3 HPLC における相対保持時間

第5章 結論

CH 4630808 原薬の製造プロセス開発を目的として、原薬中不純物の解析、生成原因の究明と、それを基にした不純物制御に関する検討をプロセス生産性向上検討と並行して行い、プロセス改良に反映させることができた。また、最終原薬の結晶形、結晶水のコントロールについても詳細な検討を行い、より高純度の原薬を安定的に取得可能な製法を確立した。

各工程について総括する。

第1工程においては、 Boc_2O の等量を1.00 eqに厳密に制御することで原薬品質向上につながり、また、反応溶媒変更により第2工程とのone-pot化に成功した。

第2工程においては、反応未達の原因を解明し、 K_2CO_3 の粒子径と、反応中の水分コントロールにて反応が安定的に進行するプロセスへと改良した。また、過剰のアルキル化剤のクエンチ法、アルキル化剤の調達に改良を加えることで品質向上を達成した。

第3工程においては、反応中の水分と試薬等量を最適化した。この工程で初めて目的物を晶析により単離し、3工程での収率は86%、化合物純度99.8%となり、高収率、高純度を達成した。

第4工程においては、第7工程において観測される不純物からさかのぼった原因がこの工程の残留試薬であることを突き止め、後処理の分液回数を増やすことで当該不純物の抑制に成功した。

第5工程においては、酸触媒による脱保護反応に伴いラクトン形成が進行を抑えるため、代替試薬を検討、TBAF / AcOHの条件を採用し、試薬と同時に中間体を変更することにした。

第6工程においては、反応基質自体が変更になり、精製なしで次工程に用いるテレスコーピ

ングを用いる方法へと変更がなされている。

第7工程においては、反応条件を環境、設備負荷の低いに変更するとともに、DOEを用いた検討を試み、効率的に反応条件を設定することができた。

第8工程においては、NaOH水溶液を用いる塩化晶析を行った。原薬の高回収量と高品質を両立するため晶析を2回行う方法に設定した。また、合わせて結晶形および結晶水の制御に関する検討を行い条件を設定した。

結果、全8工程中、取り出し回数2回ながら、安定的に高品質の原薬を得ることができる堅牢性の高い効率的なプロセス開発に成功した。この方法を用いて3 kgスケールでの治験薬製造を成功させた。

本研究成果は、新規作用機序を持つ抗HCV治療薬候補化合物CH 4630808の安定供給につながる成果であり、製造された原薬を用いた臨床試験が行われ、健常人における安全性確認およびHCV患者における薬効確認がなされた。

本研究が、C型肝炎に苦しむ多くの患者さんへの治療の一助になることを心から願っている。

謝辞

本論文を作成するにあたり、御懇篤なる御指導に加え、常に著者を暖かく励ましてくださりました三重大学名誉教授 清水 真先生に謹んで感謝申し上げます。

幾多の貴重なアドバイスと御鞭撻を賜りました三重大学大学院工学研究科教授 北川敏一先生に心から感謝を申し上げます。

本論文審査にあたり、有益な御助言、御指導を賜りました三重大学大学院工学研究科教授 久保雅敬先生、同大学院工学研究科教授 富田昌弘先生、同大学院工学研究科准教授 八谷 巖先生に深く感謝申し上げます。

著者は約 30 年前に金沢大学薬学部にて研究生生活を始め、その後企業研究者の道に進むことになりました。研究に向かう真摯な姿勢を御教示いただきました金沢大学名誉教授 故藤井 澄三先生、実験の基礎を指導いただきました大場正志博士に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えられ、幾多の貴重な御助言を賜りました中外製薬株式会社 創薬化学研究部部長 飯倉 仁博士、元部長 佐藤晴彦博士、江村 岳博士、佐藤 勉博士、および本研究をともに推進して下さった関連論文共著者の皆様に深謝申し上げます。

また、本論文は中外製薬株式会社在職中に作成されたものであり、著者が所属した部署の方々のご協力があったからこそなされたものであります。中外製薬株式会社 創薬化学研究部の皆様、製薬研究部の皆様、および中外製薬工業株式会社 藤枝工場の皆様に感謝申し上げます。

また、企業において研究活動を行うに際し、多くの側面から実験、研究をサポートして下さる方々の存在もまた不可欠のものであります。中外製薬株式会社 研究業務推進部の皆様、鹿島建物株式会社 従業員の皆様、研究関連外部業者の皆様にも厚く御礼申し上げます。

最後に、筆者の自由に進路を選択することを常に勧めてくれた亡父 羽石正文、母 羽石美智子、筆者の人生を応援し、日々の研究生生活を支えてくれた亡妻 羽石文子、娘 麻穂、海緒、歩美に心から感謝いたします。

2018 年 4 月 羽石 剛

EXPERIMENTAL SECTION

General

All reagents and solvents were purchased from commercial suppliers and used without further purification. Optical rotations were measured on a Horiba SEPA-500 automatic polarimeter at the sodium D line (589 nm). ^1H NMR spectra at 400 MHz and ^{13}C NMR spectra at 100 MHz were recorded on Bruker Ascend 400. Proton chemical shifts are reported in parts per million (δ) downfield from tetramethylsilane as an internal standard and are referenced to residual protium in the NMR solvent (CD_3OD ; δ 3.30 ppm). For ^{13}C NMR, chemical shifts are reported relative to the NMR solvent (CD_3OD ; δ 49.0 ppm) as an internal reference. NMR data are presented as follows: chemical shift (δ , ppm), integration, multiplicity (s = singlet, d = doublet, dd = double-doublet, t = triplet, q = quartet, and m = multiplet), and coupling constant. IR spectra were recorded on a JASCO FT/IR-350. High resolution mass spectra (HRMS) were recorded using Waters Xevo G2S TOF (ESI) instrument.

***tert*-Butyl (*tert*-Butoxycarbonyl)-L-tyrosinate (27)**

To a solution of *tert*-butyl-L-tyrosinate (**26**, 6.00 kg, 25.3 mol) in DMF (19.81 kg) was added Boc₂O (5.52 kg, 25.3 mol) in DMF (2.81 kg). The mixture was stirred at 25 ° C for 1 h (>99% conversion). The resulting mixture was used for the next step.

***tert*-Butyl (*S*)-3-(4-(But-2-yn-1-yloxy)phenyl)-2-((*tert*-butoxycarbonyl)amino)propanoate (28)**

To the solution of crude **27**, H₂O (0.33 kg) was added to adjust the water content (KF analysis, 1.0% weight). K₂CO₃ (14.00 kg, 101 mol) and 1-bromo-2-butyne (4.02 kg, 30.2 mol) were successively added while maintaining the temperature below 40 ° C. The slurry was stirred at 25 ° C for 1 h (>99% conversion) and stored below 40 ° C overnight. Diethylamine (0.92 kg, 12.58 mol) was added, and the mixture was stirred at 25 ° C for 1 h. Water (72.0 kg) and AcOEt (37.8 kg) were added, followed by liquid-liquid separation. The organic phase was washed with water (60.0 kg), 2% aq. KHSO₄ (60.0 kg), and 5% aq. NaCl (60.0 kg), successively.

The resulting organic phase was concentrated under reduced pressure. To the residue, AcOEt (37.8 kg) was added and this solution was used for the next step.

***tert*-Butyl (*S*)-2-Amino-3-(4-(but-2-yn-1-yloxy)phenyl)propanoate Hydrochloride (29·HCl)**

To the solution of crude **28**, 4 N HCl in AcOEt (34.9 kg, 136.9 mol) was added, and the mixture was stirred at 25 ° C for 2 h (>97% conversion). To the reaction mixture, 10% aq. NaOH (90 L) was added below 25 ° C, and the solution was stirred. The

separated organic phase was washed with 10% aq. NaCl (30.0 kg) and cooled to below 0 ° C. Water (10.2 kg) and 4 N HCl in AcOEt (5.8 kg) were added successively, and the mixture was stirred at 0 ° C for 30 min. The solid was collected by filtration, and the cake was washed with AcOEt (54.0 kg) and dried to afford **29**·HCl (7.08 kg, 86% from compound **26**, 99.8% purity by HPLC analysis, Impurity-1, 0.05%; Impurity-4, 0.04%). Colorless solid; $[\alpha]_D^{23} +17.4^\circ$ (*c* 0.51, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 1.43 (s, 9H), 1.80 (t, 3H, *J* = 2.1 Hz), 3.12 (d, 2H, *J* = 7.0 Hz), 4.12 (t, 1H, *J* = 7.0 Hz), 4.66 (q, 2H, *J* = 2.1 Hz), 6.96 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.21 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 3.1, 28.1 (3 carbons), 36.9, 55.7, 57.1, 75.1, 84.1, 85.1, 116.4 (2 carbons), 127.8, 131.6 (2 carbons), 158.9 169.2; HRMS *m/z* calcd for C₁₇H₂₃NO₃ [M + H]⁺ 290.1756, found 290.1751.

tert-Butyl (2*S*, 3*S*, *E*)-3-(((*S*)-3-(4-(But-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)-2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)ethyl)-11-(2-heptyl-1,3-dioxolan-2-yl)-2-hydroxyundec-4-enoate (**30**)

To a reactor charged with (*S*)-1-phenylethan-1-amine (*S*, *E*)-2-(((*S*)-1-(*tert*-butoxy)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-2-hydroxy-1-oxobutan-2-yl)-10-(2-heptyl-1,3-dioxolan-2-yl)dec-3-enoate (**25**, 6.00 kg, 96.1% purity, 99.39% ee, 93.4 wt %, 7.47 mol), AcOEt (27.0 kg) and 5% aq. KHSO₄ (30.0 kg) were added, and the reaction was stirred at 20 ° C for 30 min. The separated organic phase was washed with 5% aq. NaCl (60.0 kg). To the organic phase, DIPEA (4.70 kg, 36.4 mol), *tert*-butyl (*S*)-2-amino-3-(4-(but-2-yn-1-yloxy)phenyl)propanoate hydrochloride (**29**·HCl, 2.71 kg, 98.9 w%, 8.23 mol), HOBt hydrate (1.50 kg, 9.79 mol), and WSC hydrochloride (1.80 kg, 9.39 mol)

were added, and the reaction was stirred at 20 ° C for 4 h (>95% conversion). The reaction mixture was washed with 10% aq. citric acid (60.0 kg), 10% aq. citric acid/2% aq. NaCl (60.0 kg), and 5% aq. NaCl (60.0 kg) successively, and this solution was used for the next step.

tert-Butyl (2*S*, 3*S*, *E*)-3-(((*S*)-3-(4-(But-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)-11-(2-heptyl-1,3-dioxolan-2-yl)-2-hydroxy-2-(2-hydroxyethyl)undec-4-enoate (39)

To the solution of crude **30**, AcOH (0.58 kg, 9.66 mol) and TBAF (1 M in THF, d = 0.903, 8.70 kg, 9.64 mol) were added, and the mixture was stirred at 20 ° C for 3 h (>95% conversion). 5% aq. NaHCO₃ (60.0 kg) was added to the mixture, followed by liquid-liquid separation. The organic phase was concentrated under reduced pressure. To the residue, MeCN (23.5 kg) was added, and this solution was used for the next step.

(3*S*, 4*S*, *E*)-4-(((*S*)-3-(4-(But-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1-(*tert*-butoxy)-1-oxopropan-2-yl)carbamoyl)-3-(*tert*-butoxycarbonyl)-12-(2-heptyl-1,3-dioxolan-2-yl)-3-hydroxydodec-5-enoic Acid (40)

To the solution of crude **39**, iodobenzene diacetate (7.16 kg, 22.2 mol) was added in four portions below 15 ° C; then, water (3.00 kg) and 4-acetamido-TEMPO (0.34 kg, 1.59 mol) were added, and the mixture was stirred at 15 ° C for 1 h (>95% conversion). 5% aq. Na₂S₂O₃ (30.0 kg) and AcOEt (27.0 kg) were added, followed by liquid-liquid separation. The separated organic phase was washed with 20% aq. NaCl (30.0 kg) and

evaporated under reduced pressure. To the residue, MeCN (23.5 kg) was added and evaporated under reduced pressure; then, MeCN (23.5 kg) was added again, and this solution was used for the next step.

(*S*)-2-((*S*, *E*)-1-(((*S*)-2-(4-(But-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1-carboxyethyl)amino)-1,11-dioxooctadec-3-en-2-yl)-2-hydroxysuccinic Acid (13, CH4630808)

To a solution of crude **40**, water (0.23 kg) and sulfuric acid (2.80 kg, 28.6 mol) were added below 15 ° C, and the solution was stirred at 25 ° C for 1 h (>95% conversion). Water (30.0 kg) and AcOEt (27.0 kg) were added, followed by liquid-liquid separation. The separated organic phase was washed with 10% aq. NaCl twice (30.0 kg each time) and then concentrated under reduced pressure. To the residue, MeCN (14.1 kg) was added, and the solution was transferred to a SUS container using MeCN (4.70 kg) and stored at 5 ° C; this solution was used for the final steps.

(*S*)-2-((*S*, *E*)-1-(((*S*)-2-(4-(But-2-yn-1-yloxy)phenyl)-1-carboxyethyl)amino)-1,11-dioxooctadec-3-en-2-yl)-2-hydroxysuccinic Acid (13·1.5Na·2.5H₂O)

Step 1

A stored solution of crude **13** was used to charge the reactor, which was passed through a line filter through which water (12.0 kg) was added. After warming to 35 ° C, the solution was adjusted to pH 4.8 by adding 10% aq. NaOH (3.16 kg), and then 20% aq. NaCl (8.80 kg) was added. The solution was readjusted to pH 4.8 by adding 10% aq. NaOH (2.10 kg). MeCN (0.45 kg) was added to adjust the MeCN/water =

1:1 (v/v). After the solution had been stirred at 5 ° C for 2 h, the solid was filtered and washed with chilled MeCN/water = 4:1 (14.9 kg) to obtain the wet solid.

Step 2

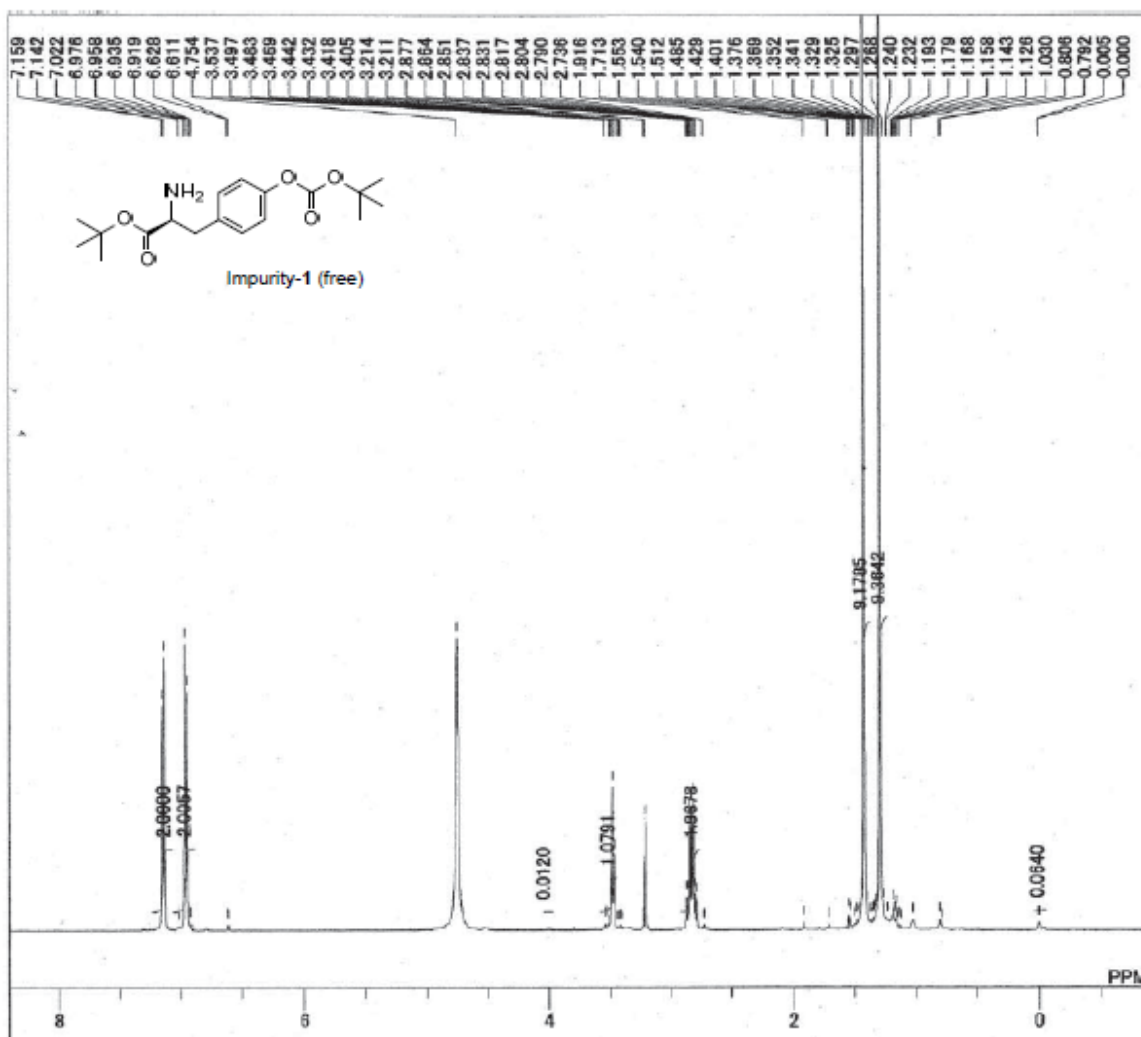
The wet solid and water (15.0 kg) were placed in the reactor, and 10% aq. NaOH (3.30 kg) and MeCN (13.7 kg) were added (pH > 13). After the mixture had been stirred at 35 ° C for 30 min, 2 N aq. HCl (3.98 kg) was added to adjust the pH to 4.8; then, MeCN (2.96 kg) was added. The resulting slurry was stirred at 35 ° C for 1 h and filtered, and the cake was washed with MeCN/water = 4:1 (14.9 kg) and dried under 50% RH at 30 ° C to afford **13**·1.5Na·2.5H₂O as a colorless solid (3.28 kg, 55% from compound **25**, 99.62% purity by HPLC analysis, Impurity-**5**, 0.07%); $[\alpha]_D^{23}$ -18.2° (c 0.63, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ: 0.89 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz) 1.23-1.37 (m, 14H), 1.47-1.57 (m, 4H), 1.81 (t, 3H, *J* = 2.7 Hz), 1.94-2.00 (m, 2H), 2.40-2.45 (m, 4H), 2.53 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz) 2.80, (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 2.96 (dd, 1H, *J* = 7.5, 14.0 Hz), 3.12 (dd, 1H *J* = 4.8, 14.0 Hz), 3.17-3.20 (m, 1H), 4.53 (dd, 1H, *J* = 5.4, 7.5 Hz), 4.59 (q, 1H, *J* = 2.7 Hz), 5.50-5.60 (m, 2H), 6.82 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.15 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ: 3.2, 14.4, 23.7, 24.9, 24.9, 30.0, 30.0, 30.1, 30.2, 30.3, 32.9, 33.6, 38.0, 43.5, 43.5, 43.7, 56.3, 57.1, 58.0, 75.4, 77.9, 83.9, 115.7 (2 carbons), 125.4, 131.3, 131.5 (2 carbons), 136.7, 158.1, 174.0, 175.2, 176.4, 177.9, 214.5; IR (KBr), 3392, 2926, 2850, 1705, 1644, 1594, 1511, 1239, 1215 cm⁻¹; HRMS *m/z* calcd for C₃₅H₄₉NO₁₀ [M + H]⁺ 644.3434, found: 644.3414.

単離不純物のスペクトルチャート

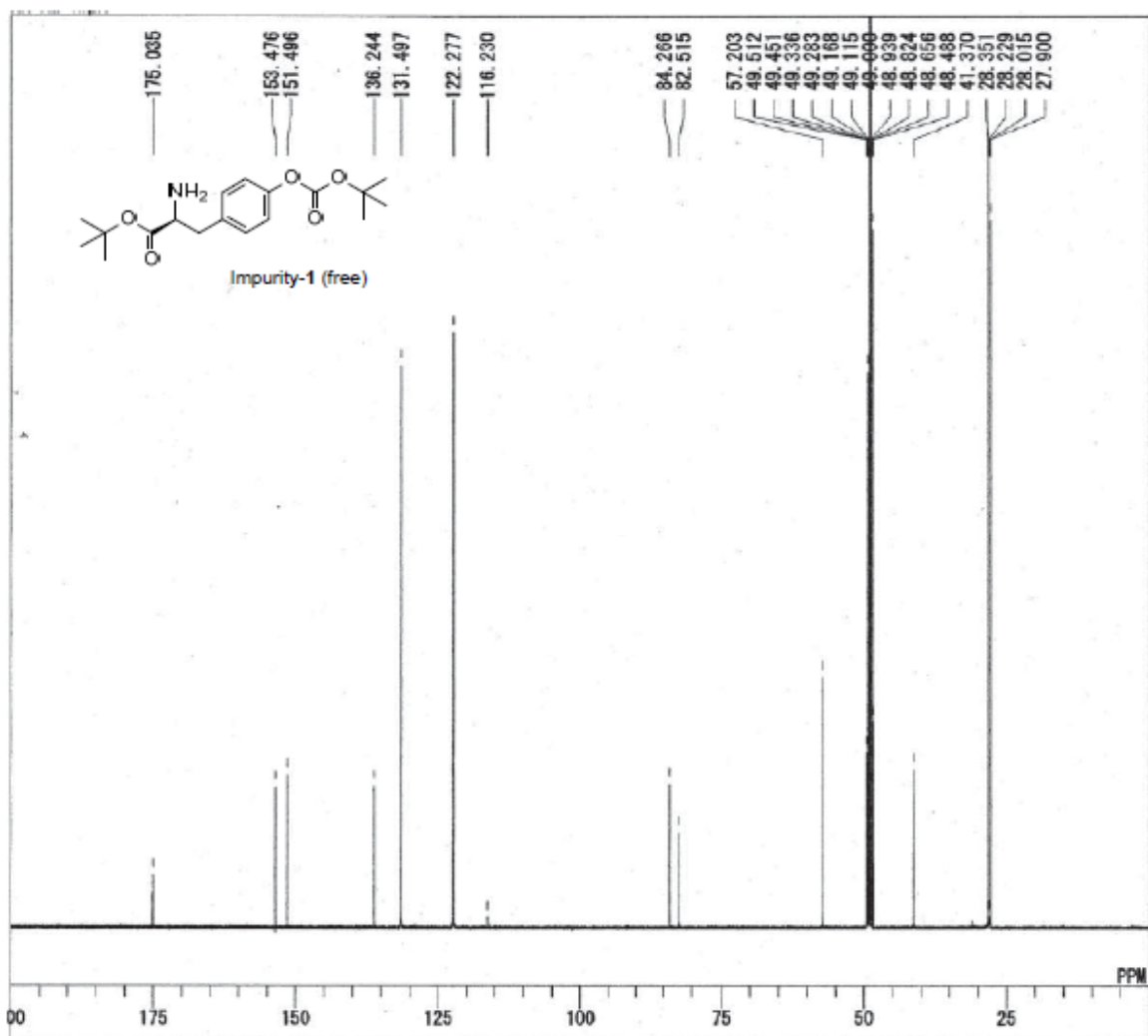
本研究の主題のひとつである不純物制御に関して、単離された各不純物それぞれのスペクトルチャートを以下に示す。

また、比較参考のために目的化合物である化合物 **29**、および API (**13**· 1.5Na· 2.5H₂O) のチャートも合わせて収載した。

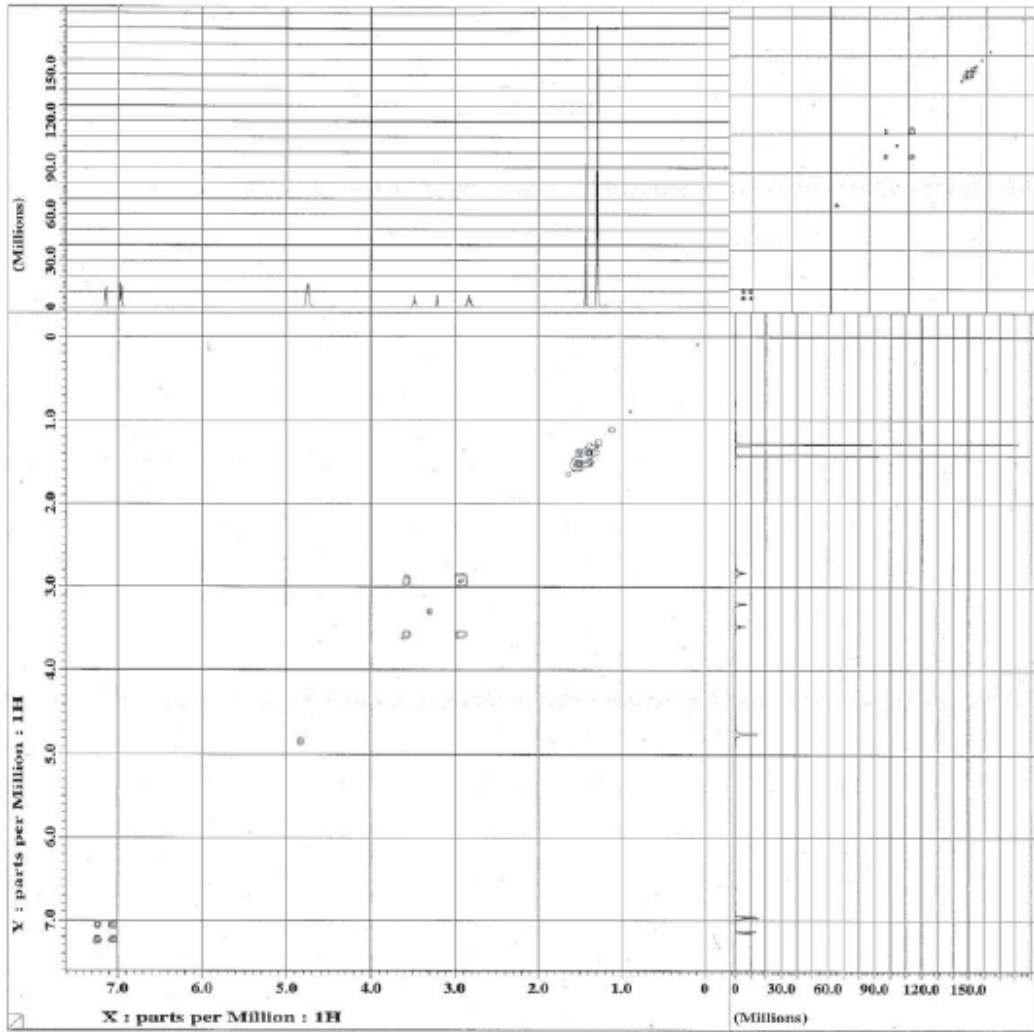
¹H-NMR spectra of Impurity-1 (free form)



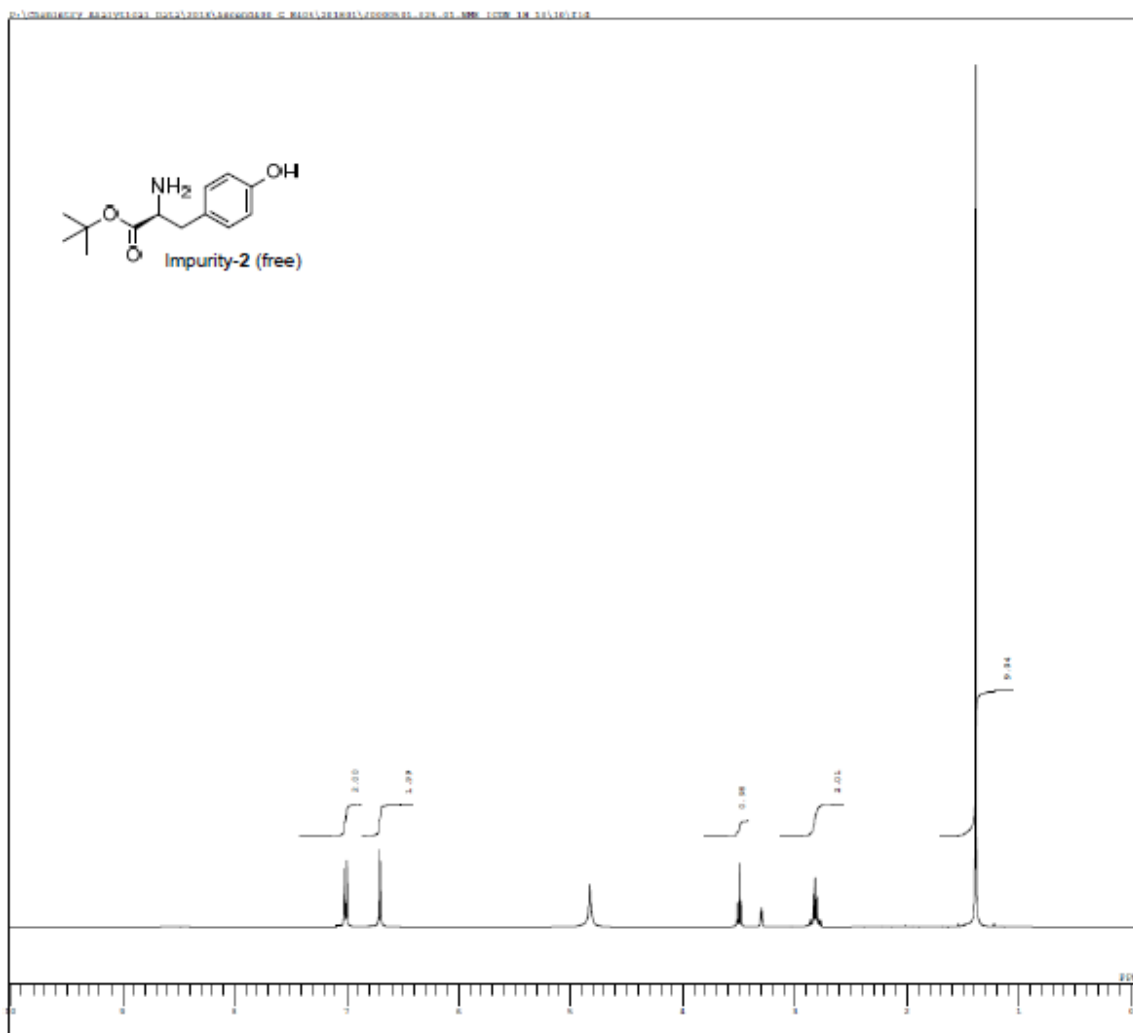
¹³C-NMR spectra of Impurity-1 (free form)



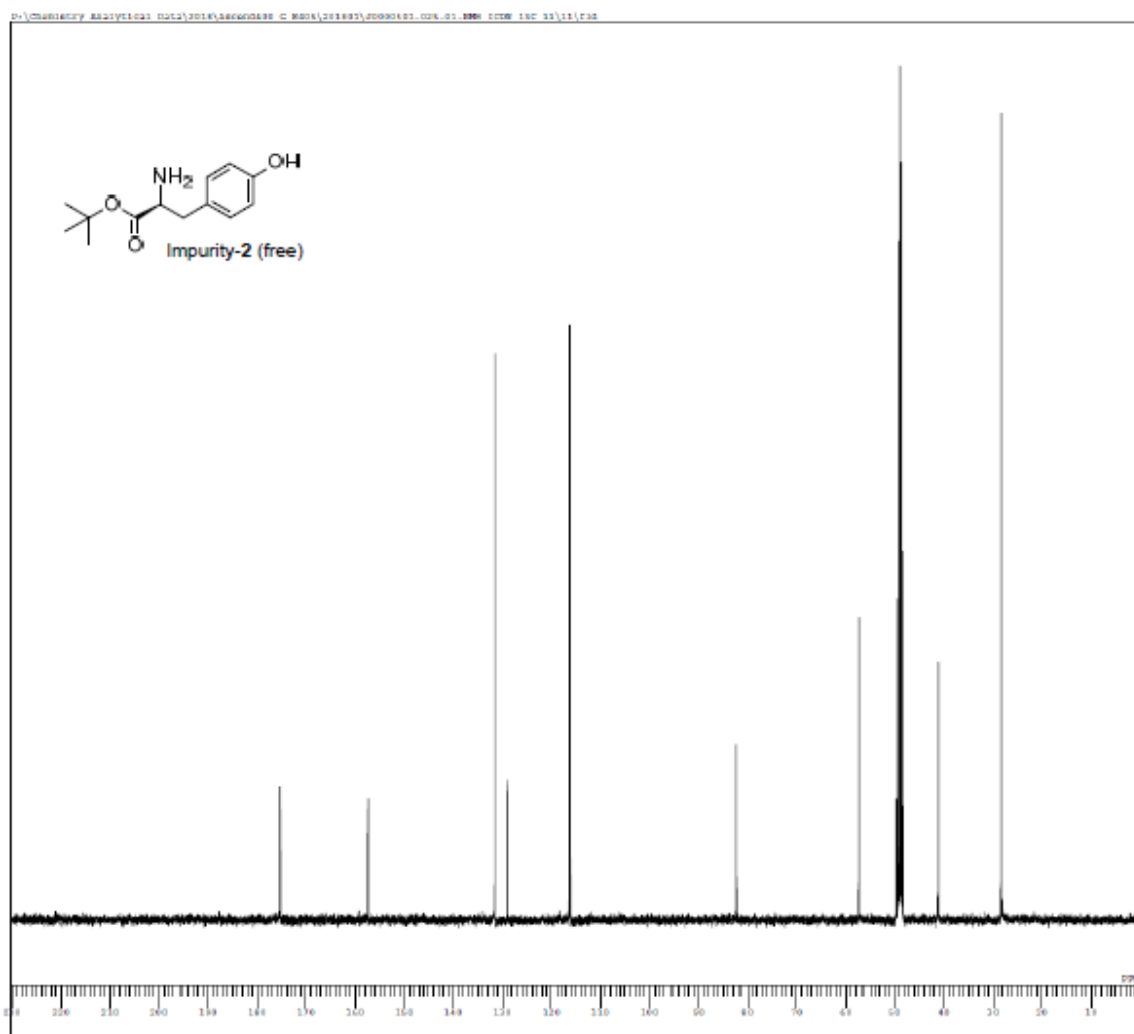
^1H -COSY spectra of Impurity-1 (free form)



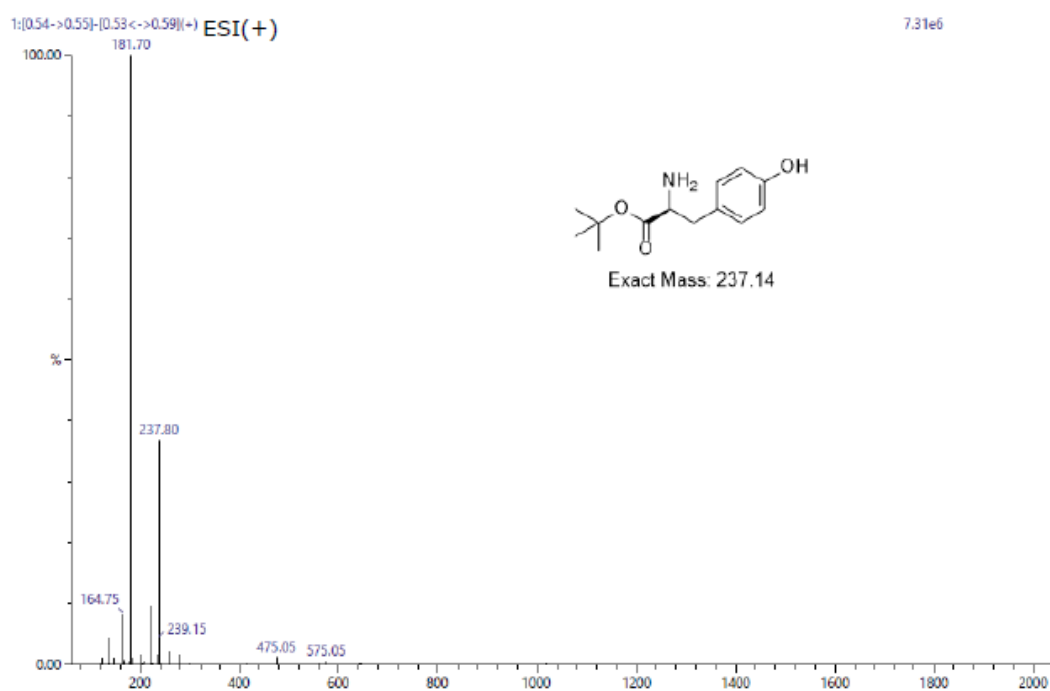
¹H-NMR spectra of Impurity-2 (free form)



¹³C-NMR spectra of Impurity-2 (free form)

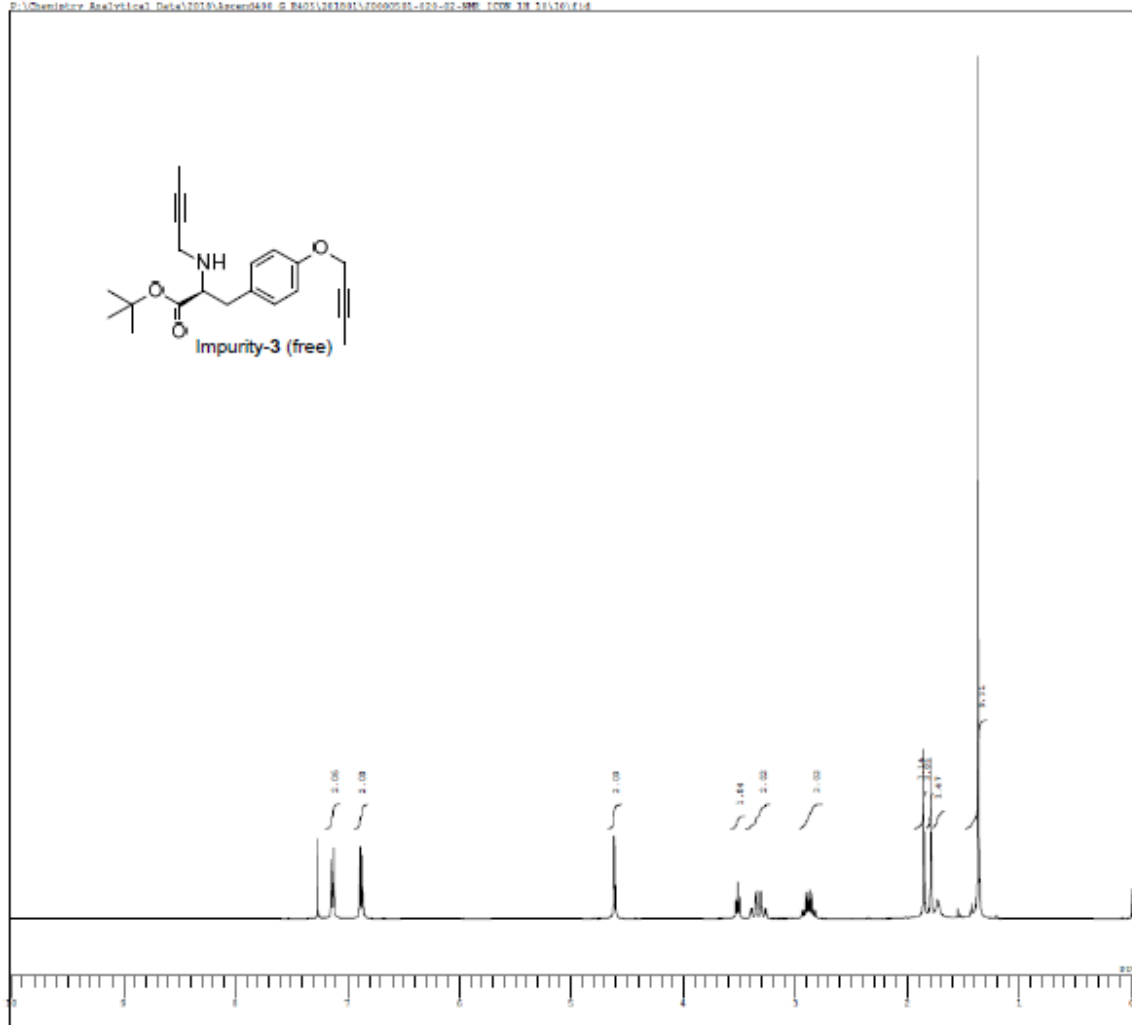


MS spectra of Impurity-2 (free form)

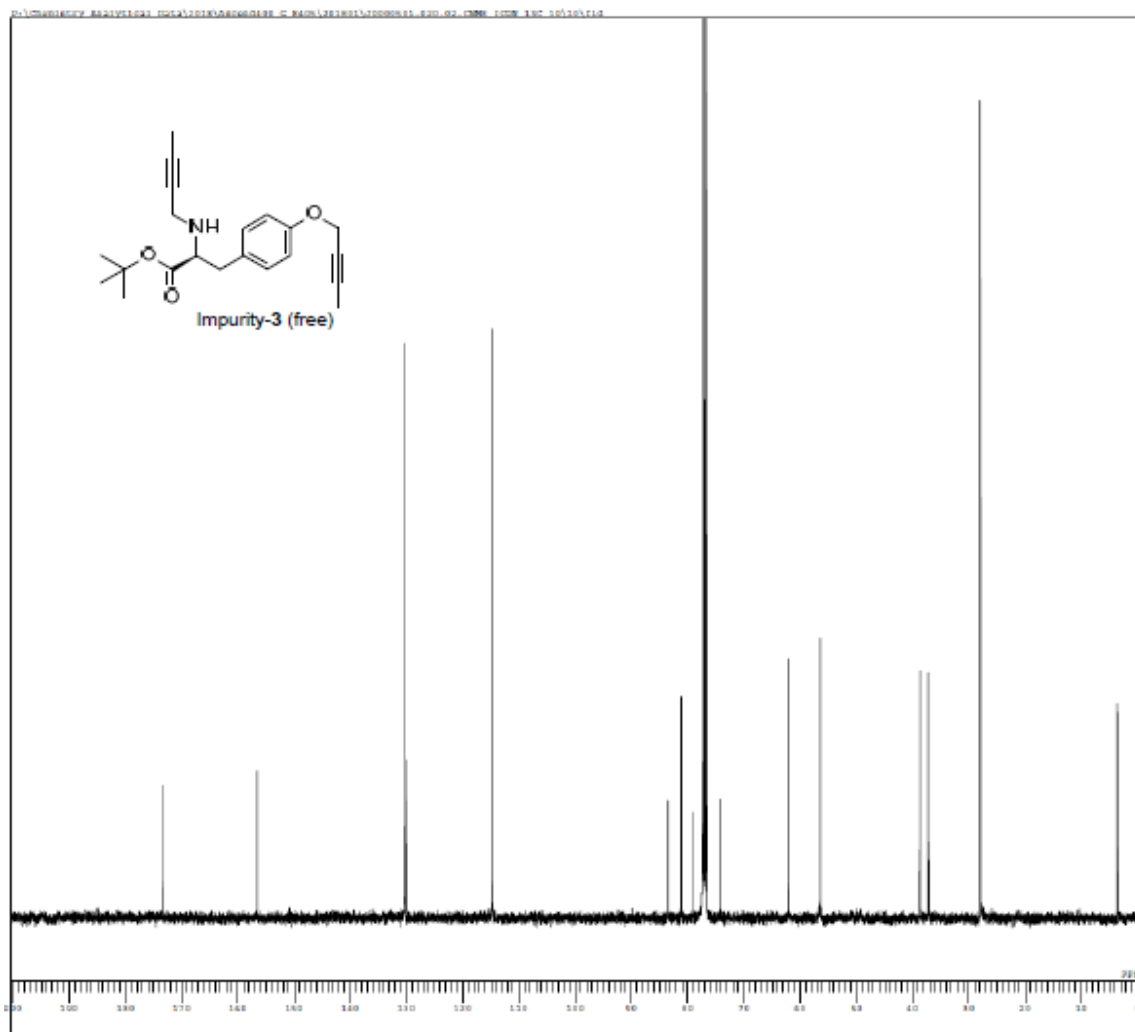


¹H-NMR spectra of Impurity-3 (free form)

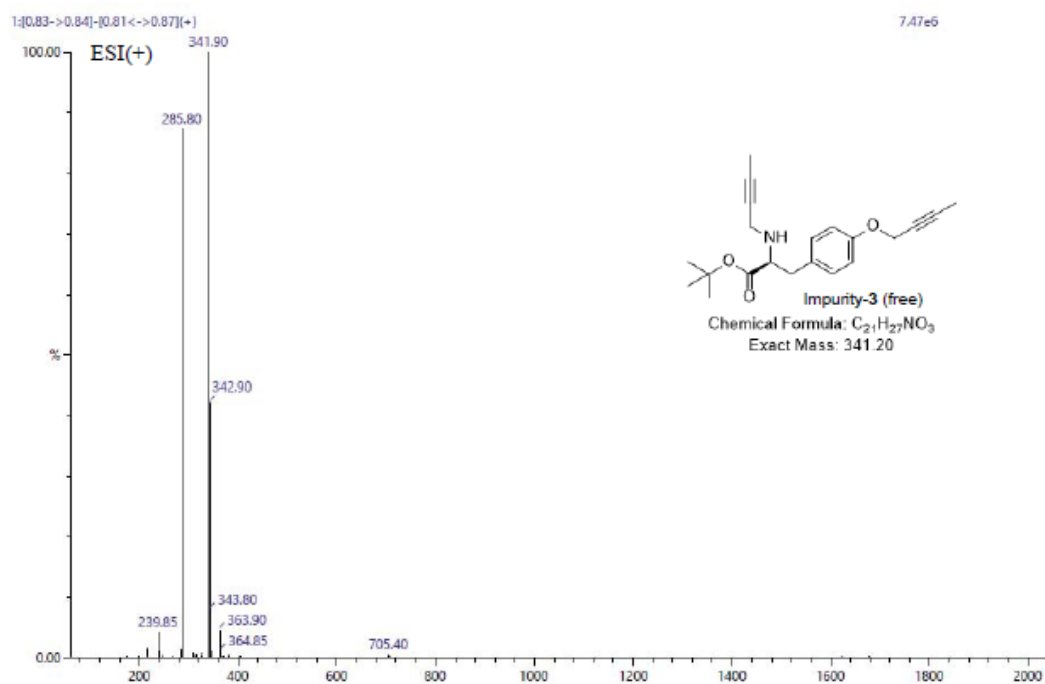
F:\Chemistry_Analytical_Data\2013\Screen\438_8_8405\201301\20090501-020-02-NMR_1009_13_11\10.f1d



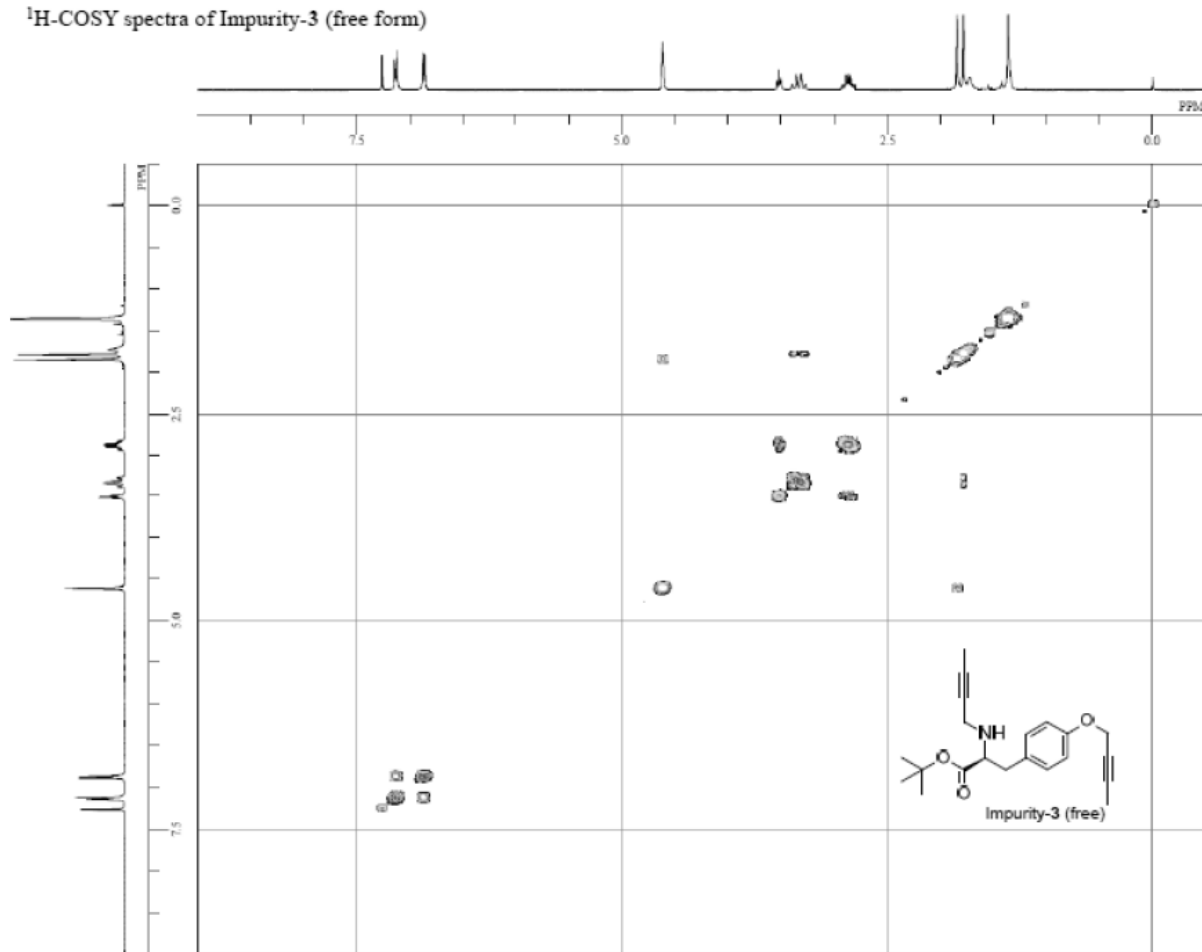
¹³C-NMR spectra of Impurity-3 (free form)



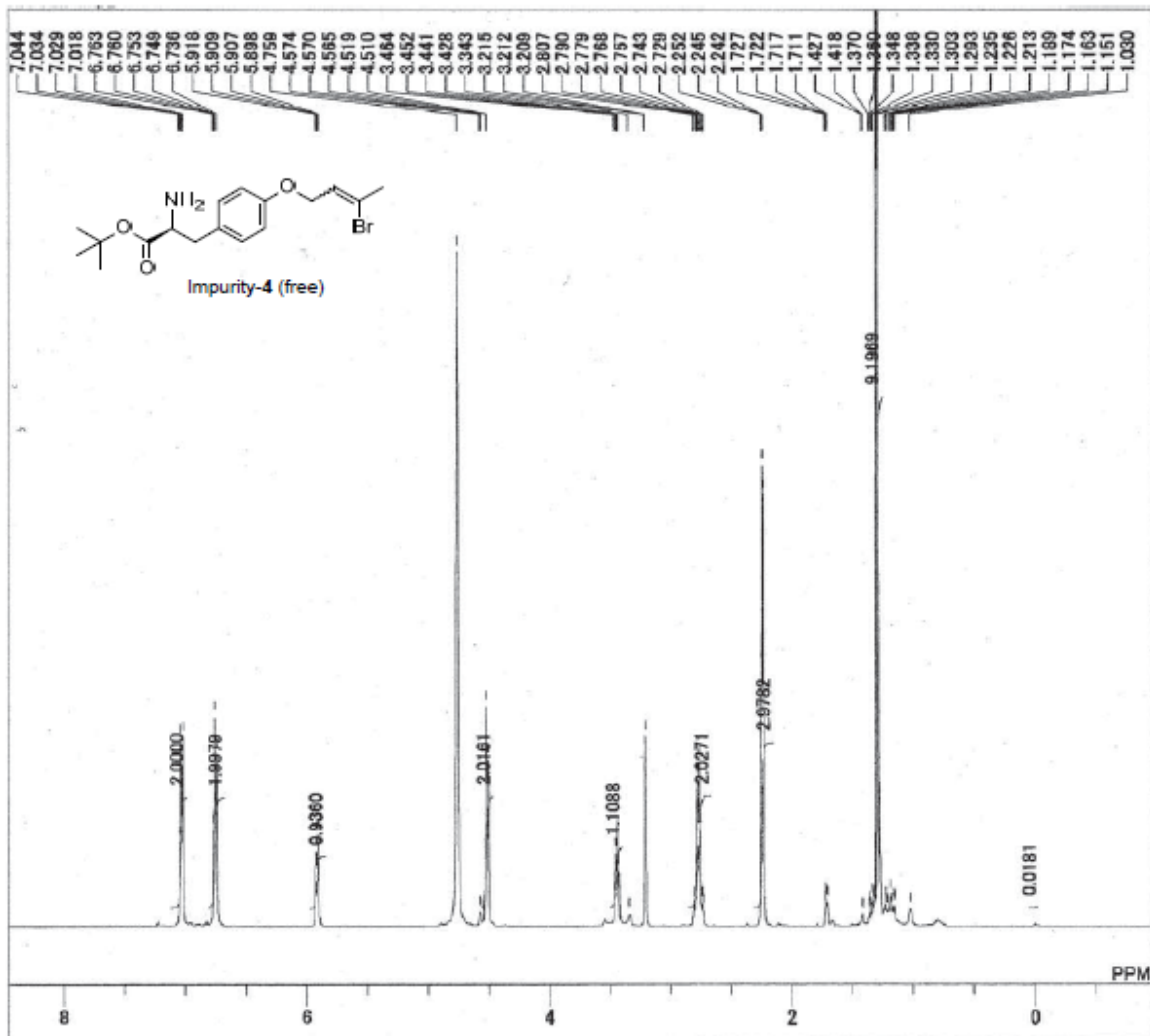
MS spectra of Impurity-3 (free form)



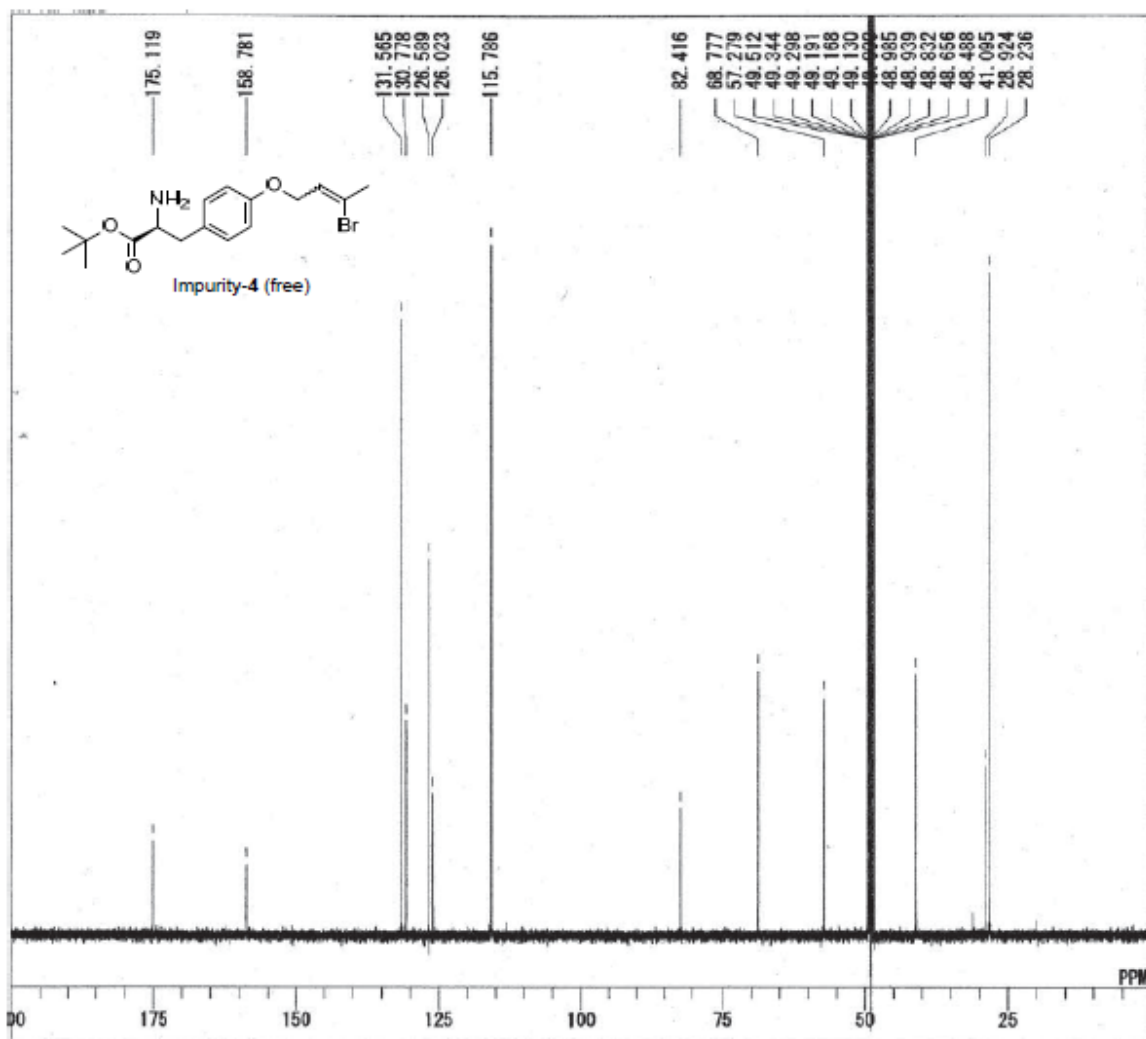
¹H-COSY spectra of Impurity-3 (free form)



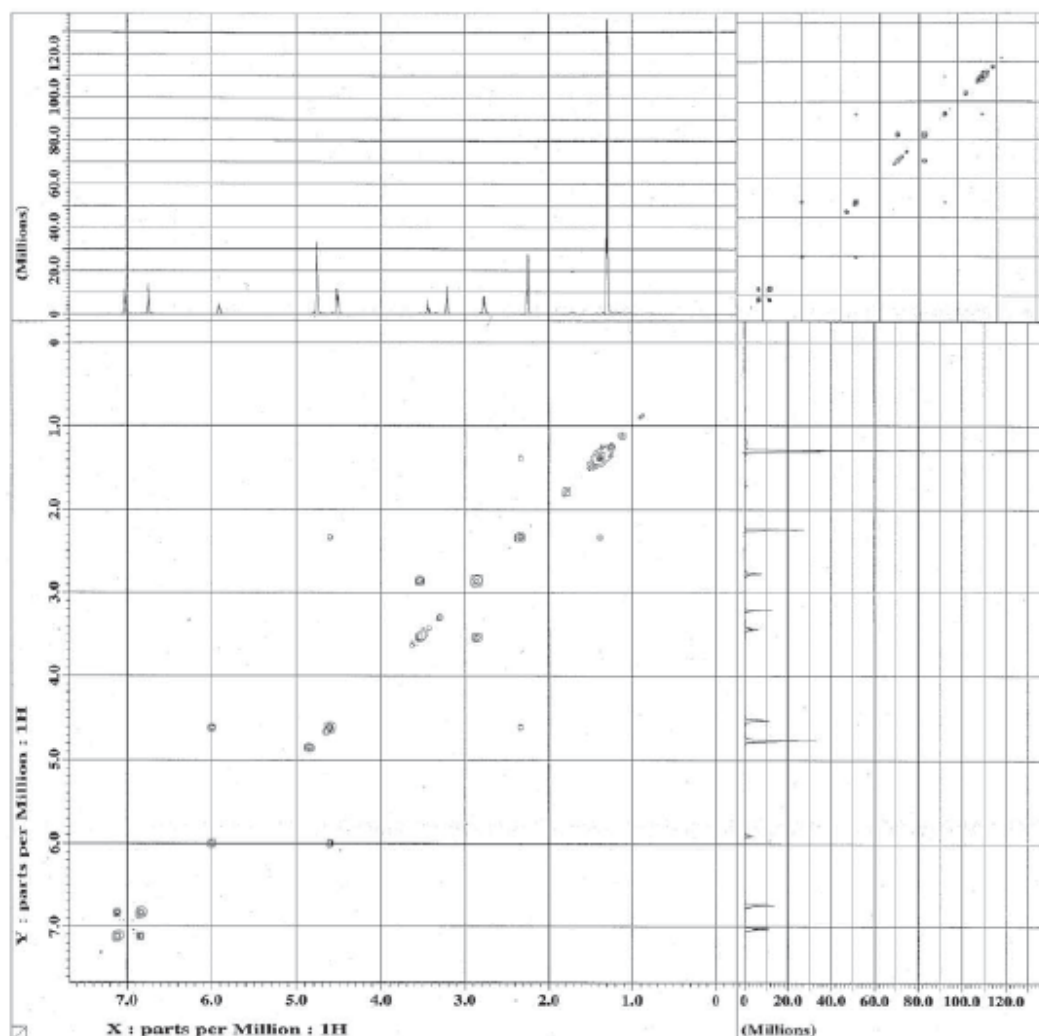
¹H-NMR spectra of Impurity-4 (free form)



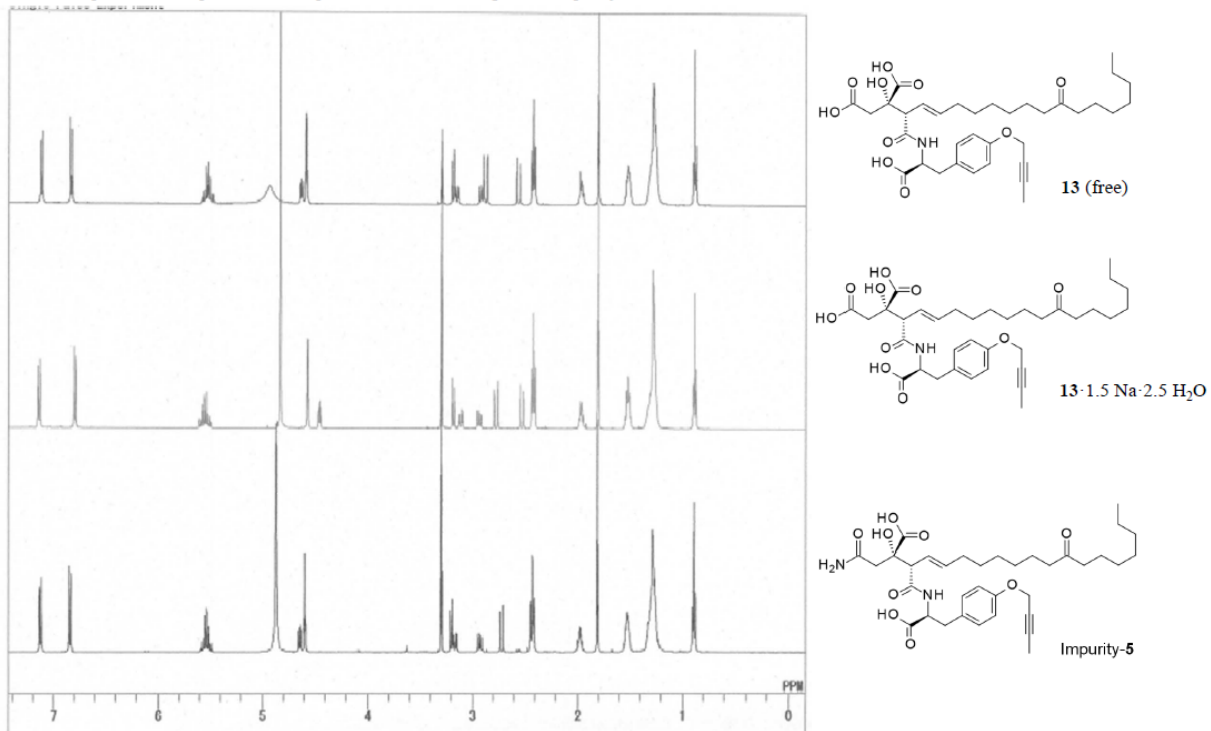
¹³C-NMR spectra of Impurity-4 (free form)



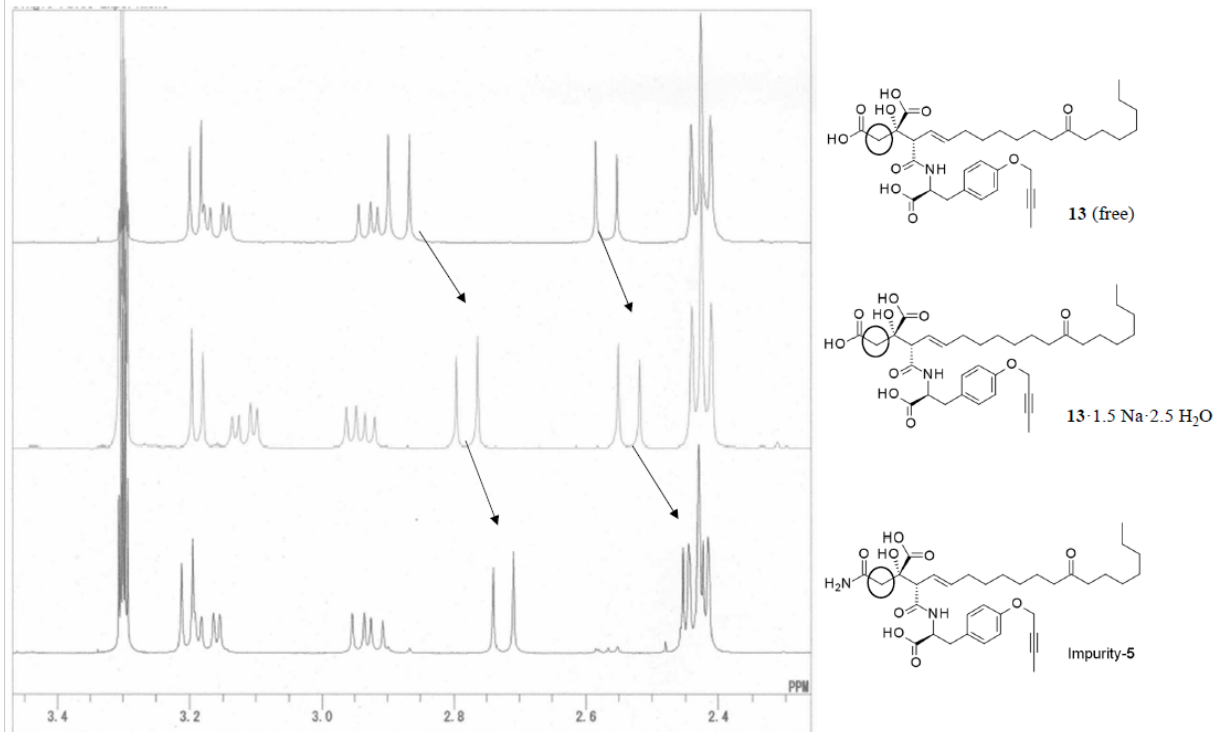
^1H -COSY spectra of Impurity-4 (free form)



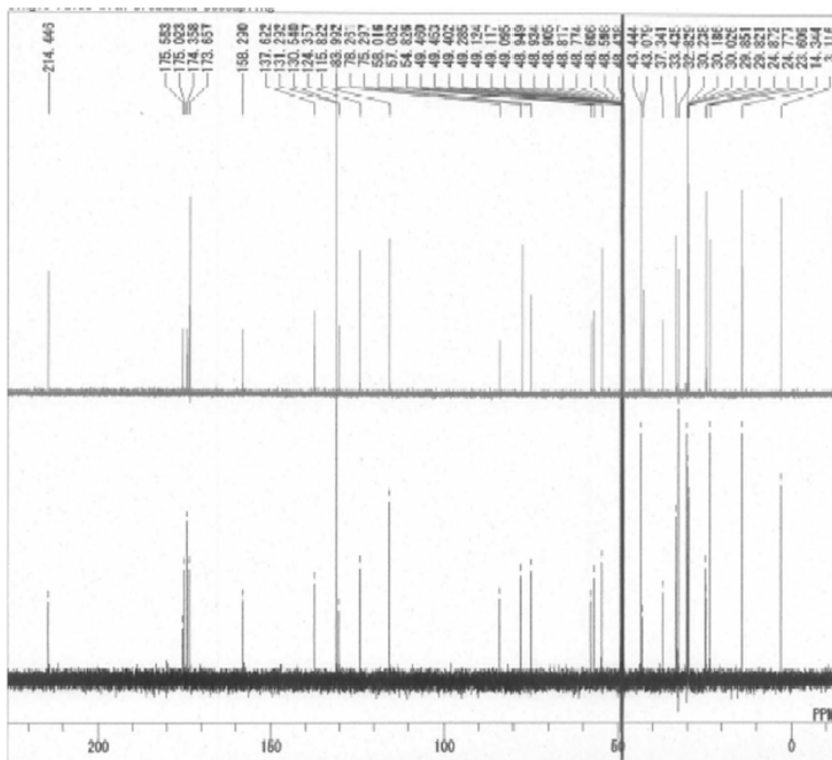
¹H-NMR spectra of Compound 13, Compound 13·1.5 Na·2.5 H₂O, and Impurity-5



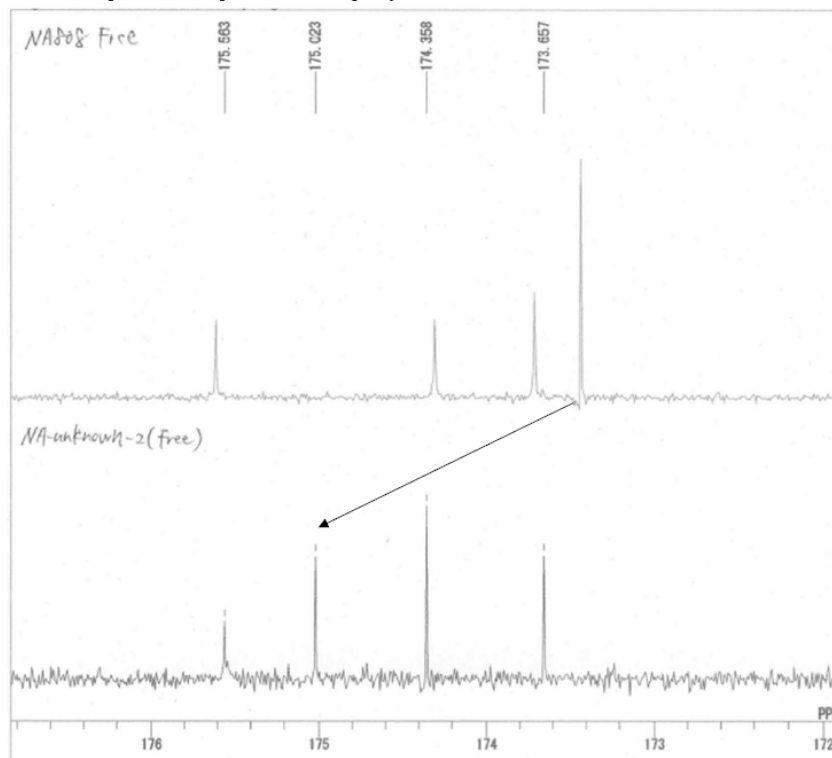
¹H-NMR spectra of Compound 13, Compound 13·1.5 Na·2.5 H₂O, and Impurity-5



¹³C-NMR spectra of Compound 13 and Impurity-5

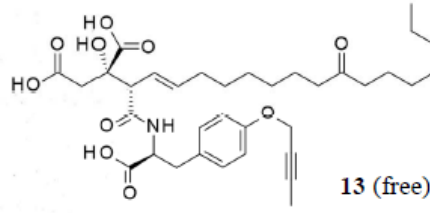
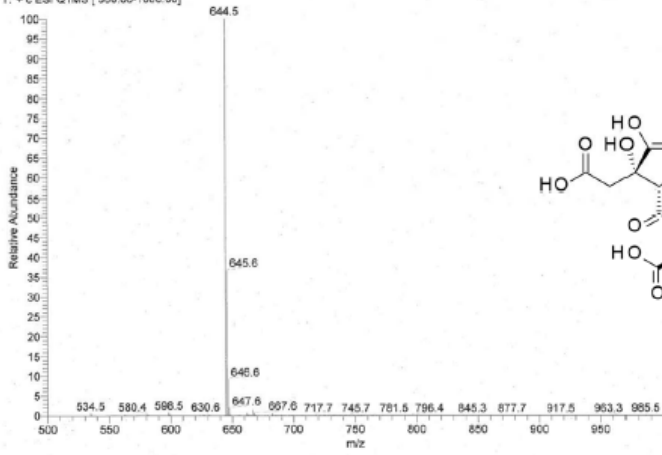


¹³C-NMR spectra of Compound 13 and Impurity-5



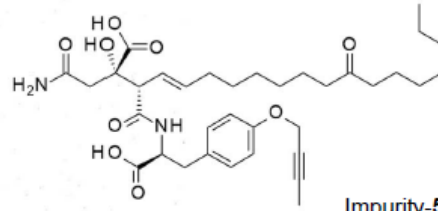
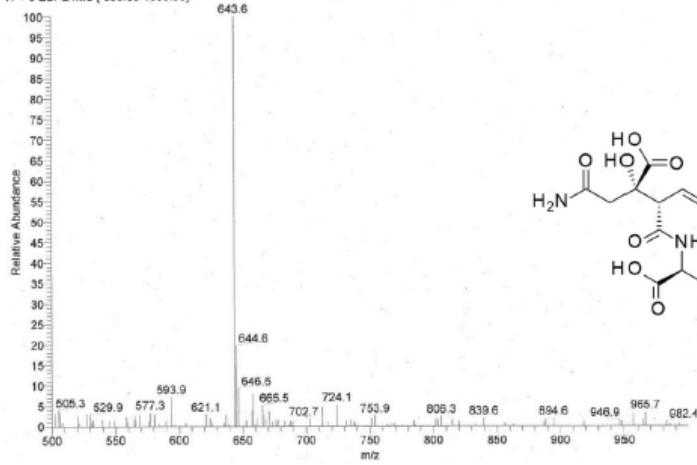
MS spectra (ESI+) of Compound 13 and Impurity-5

TT070223MS02 #1098-1118 RT: 36.81-37.48 AV: 21 SB: 36 32.38-33.55 NL: 4.05E4
T: + c ESI Q1MS [500.00-1000.00]



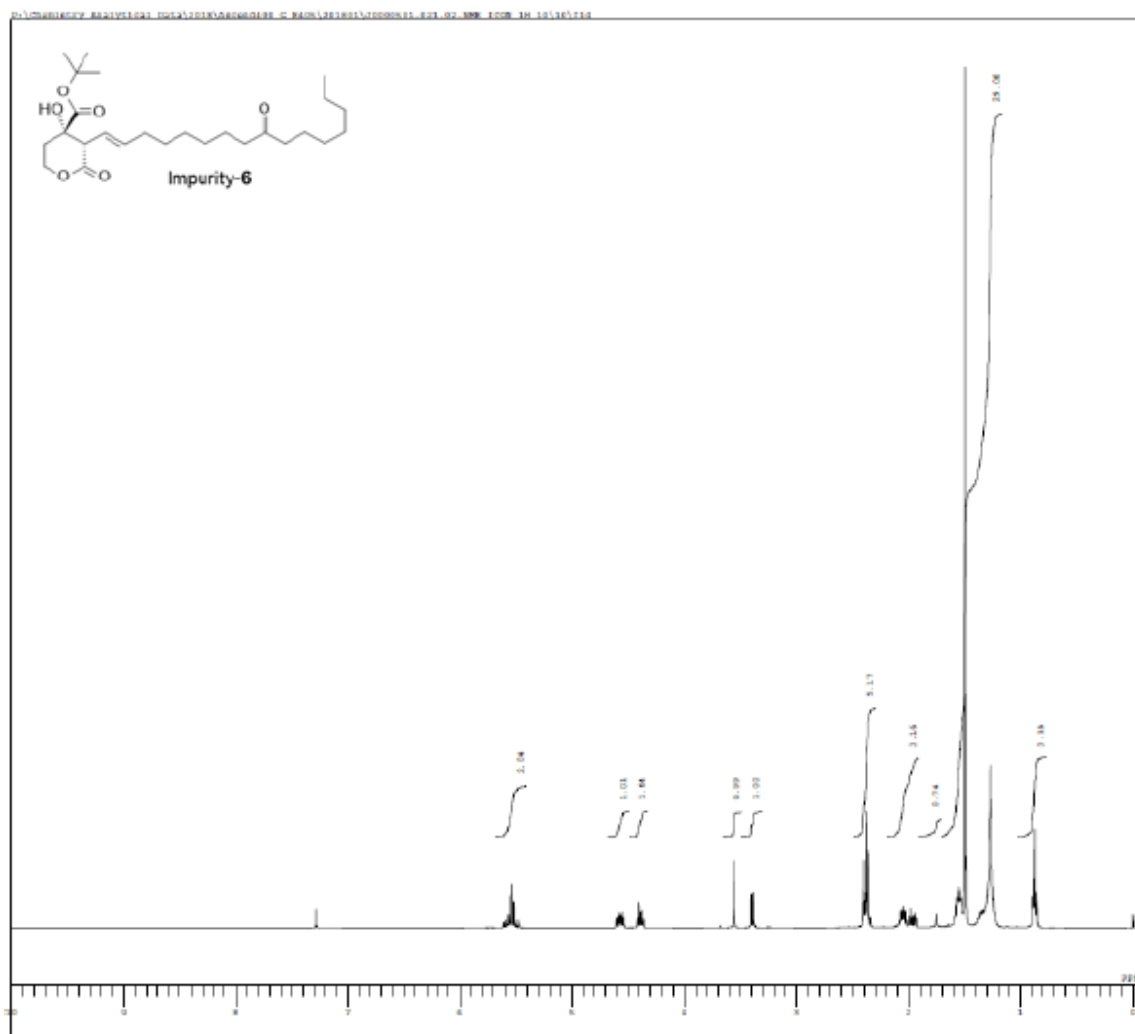
13 (free)
Exact Mass: 643.34

TT070223MS02 #1026-1043 RT: 34.39-34.96 AV: 16 SB: 36 32.38-33.55 NL: 6.06E2
T: + c ESI Q1MS [500.00-1000.00]



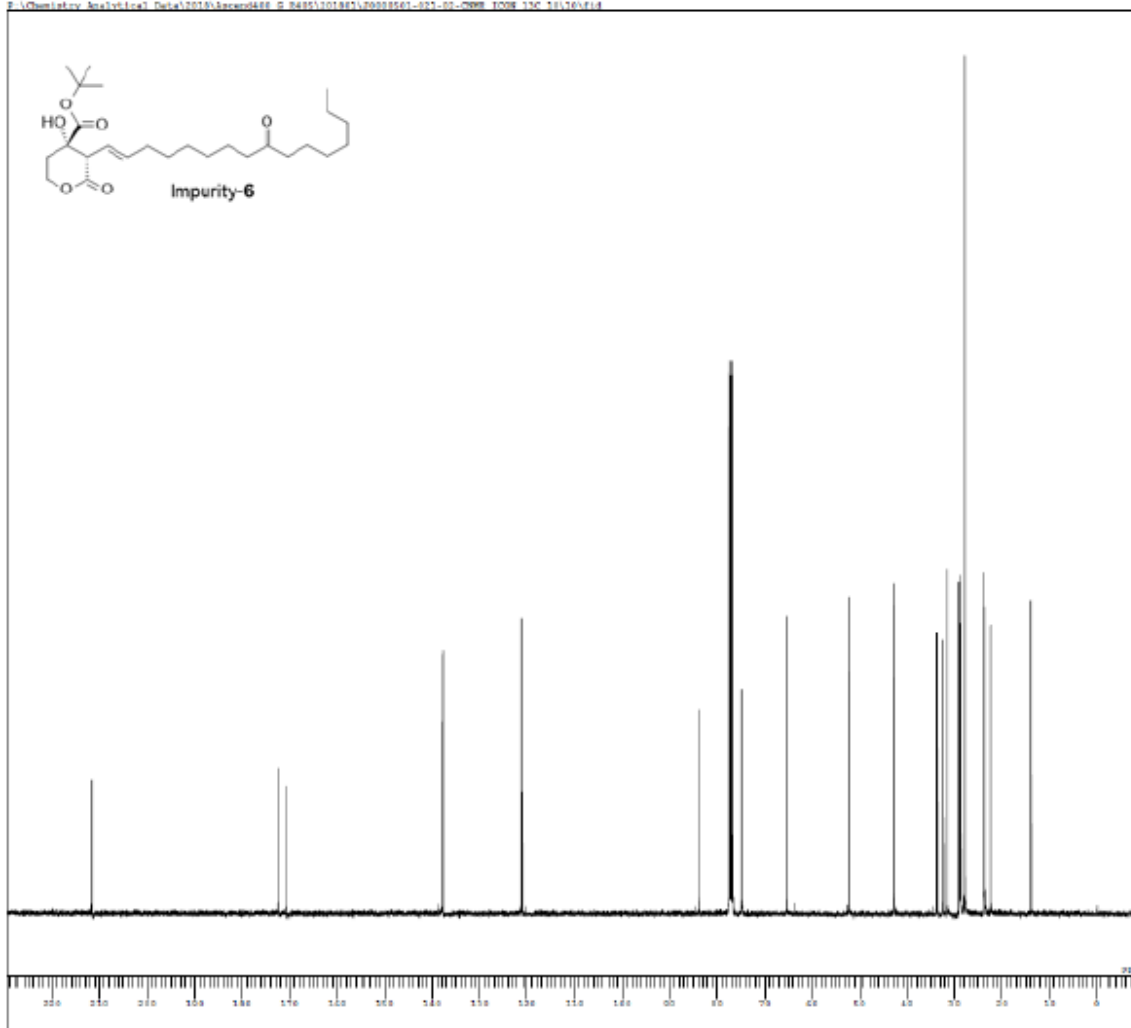
Impurity-5
Exact Mass: 642.35

¹H-NMR spectra of Impurity-6

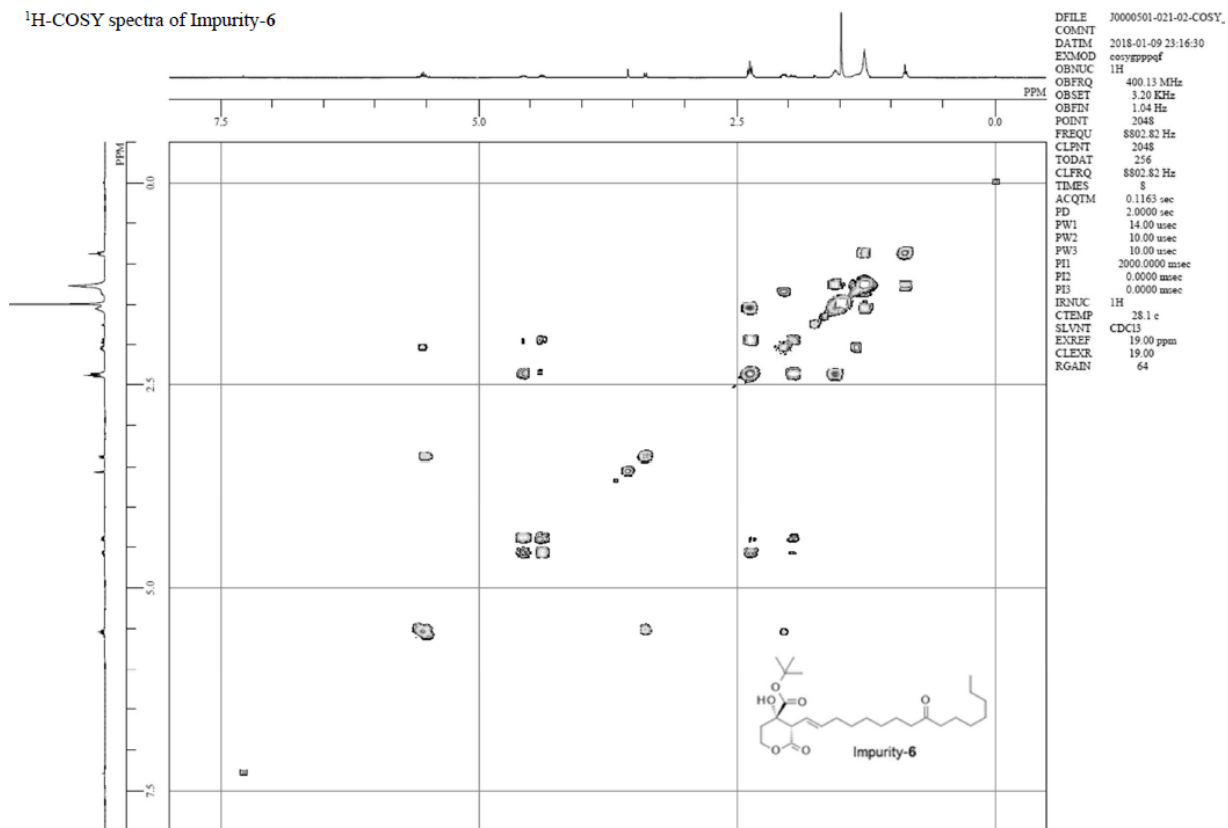


¹³C-NMR spectra of Impurity-6

F:\Chemistry_Analytical_Data\2019\Access488_G_8485\101981\20088561-021-01-CR08_T00E_13C_10170\F14

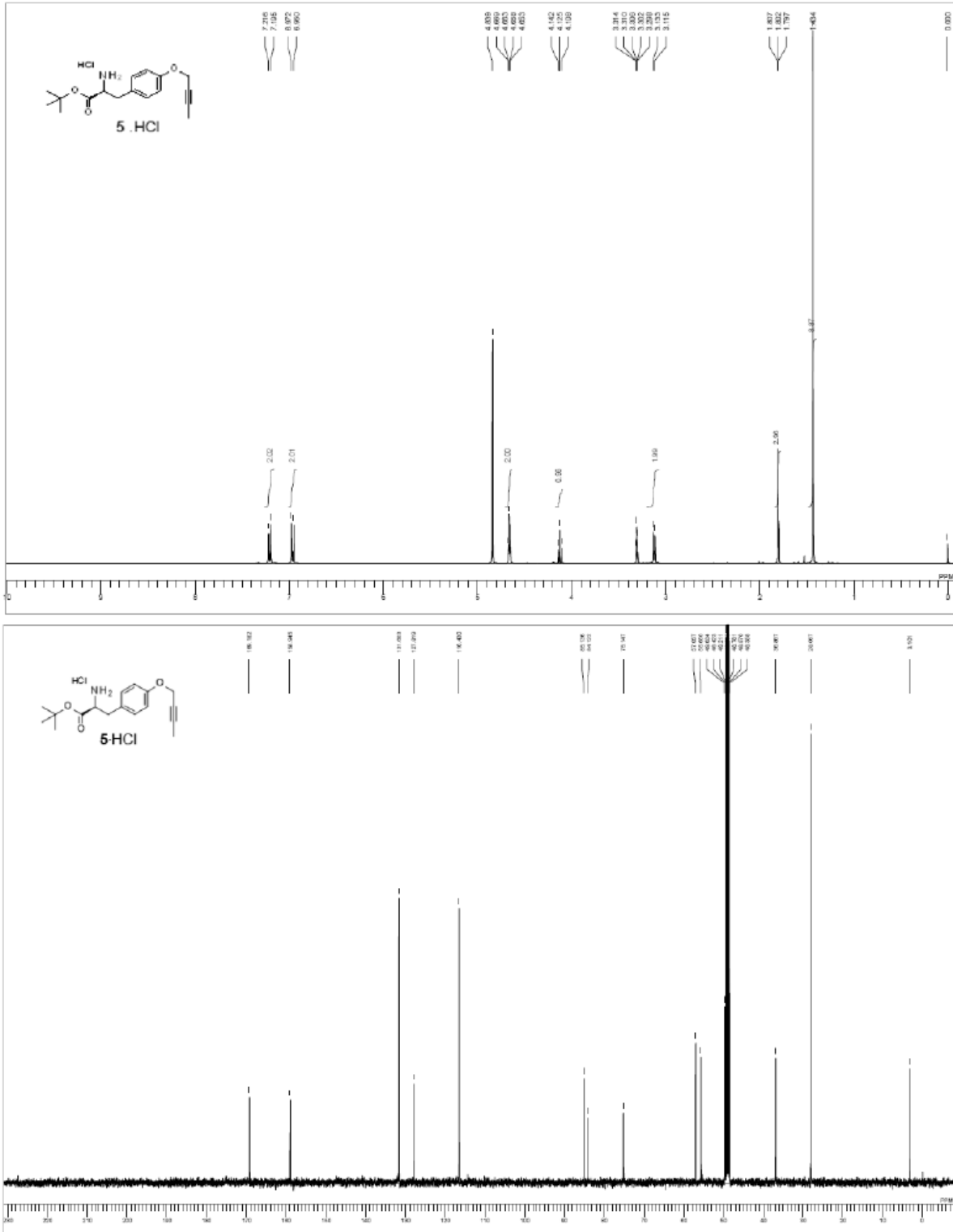


¹H-COSY spectra of Impurity-6



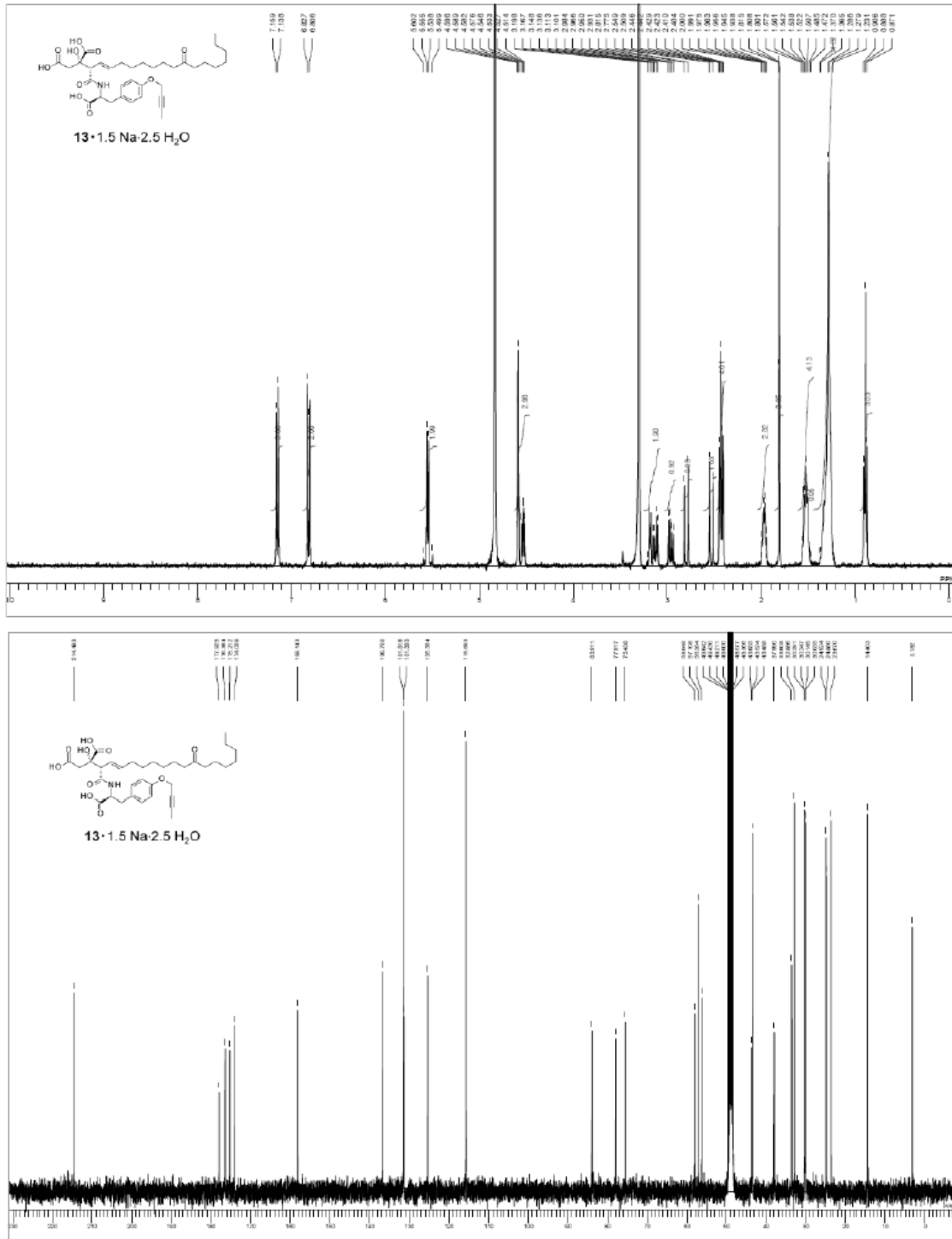
化合物 **29** · **HCl** のスペクトルデータ

上 : $^1\text{H-NMR}$ Spectra, 下 : $^{13}\text{C-NMR}$ spectra

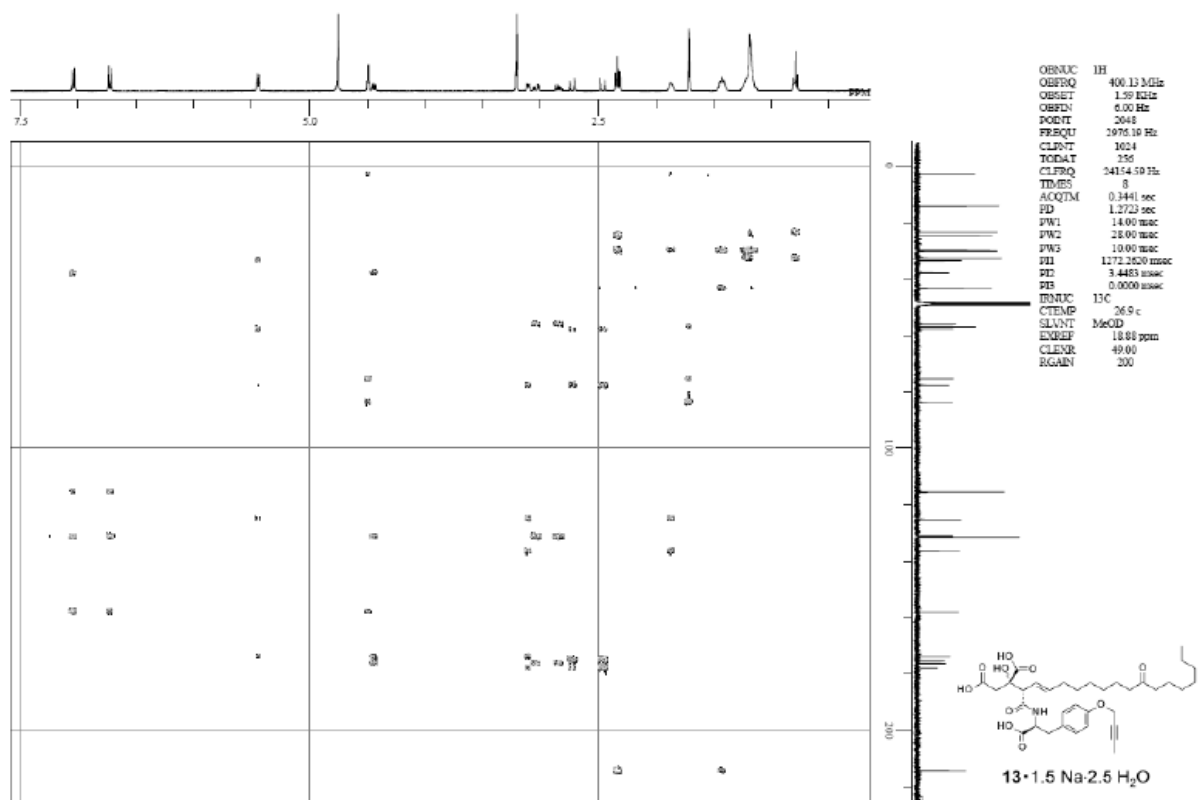


化合物 13 · 1.5 Na · 2.5 H₂O のスペクトルデータ

上 : ¹H-NMR Spectra, 下 : ¹³C-NMR spectra



HMBC spectra



関連論文

Development of a Kilogram-Scale Synthesis of a Novel Anti-HCV Agent, CH4630808.

Tsuyoshi Haneishi, Yoshiaki Kato, Hiroshi Fukuda, Tomoyuki Shimamura, Takemi Tanokura, Akira Hiraide, Kaichiro Koyama, Masato Fudesaka, Kenji Maeda, Nobuyuki Nakata, Masahiro Nagase, Takahiko Yabuzaki, Hiroaki Takao, Masaharu Kigawa, Hitoshi Shimizu, and Makoto Shimizu

Org. Process Res. Dev., **22**, 236-240. (2018).

参考文献

1. Nature Outlook, **2011**, 474.
2. Pawlotsky, J. M., *Hepatology*, 39, **2006**, 207.
3. Strader DB, Wright T, Thomas DL, Seeff LB, *Hepatology*, 39, **2004**, 1147-1171.
4. 川崎健一、坂本洋、須藤正幸、青木雅弘、佃拓夫、化学と生物 Vol.48, No10, **2010**, 674-679.
5. Sakamoto, H., Okamoto, K., Aoki, M., Kato, H., Katsume, A., Ohta, A., Tsukuda, T., Aoki, Y., Arisawa, M., Kohara, M., Sudoh, M.; *Nature Chemical Biology*, **2005**, 1, 333-337.
6. Gale, M., Blakely, C., Kwieciszewski, B., Tan, S., Dossett, M., Tan, N., Korth, M., Poluak, S., Gretch, D., *Mol. Cell. Biol.*, 18, **1998**, 5208-5218.
7. Hassel, B. A., Zhou, A., Sotomayor, C., Maran, A., Silverman, R., *EMBO J*, 12, **1993**, 3297-3304.
8. Li, X., Blackford, J., Hassel, B., *J. Virol.*, 72, **1998**, 2752-2759.
9. Miyake, Y., Kozutsumi, Y., Nakamura, S., Fujita, T., Kawasaki, T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211, **1995**, 396-403.
10. Braun, P., Snell, E., *J. Biol. Chem.*, 243, **1968**, 3775-3783.
11. Yasuda, S., Kitagawa, H., Ueno, M., Ishitani, H., Fukasawa, M., Nishijima, M., Kobayashi, S., Hanada, K., *J. Biol. Chem.*, 276, **2001**, 43994-44002.
12. Aizaki, H., Lee, K., Sung, V., Ishiko, H., Lai, M., *J. Virol.*, 324, **2004**, 450-461.
13. Shi, S., Lee, K., Aizaki, H., Hwang, S., Lai, M., *J. Virol.*, 77, **2003**, 4160-4168.

14. Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Müh U, Welker M, Wincheringer D, Zhou Y, Chu HM, Lin C, Weegink C, Reesink H, Zeuzem S, Kwong AD. *Gastroenterology*, 132, **2007**, 1767-1777.
15. Katsume A, Tokunaga Y, Hirata Y, Munakata T, Saito M, Hayashi H, Okamoto K, Ohmori Y, Kusanagi I, Fujiwara S, Tsukuda T, Aoki Y, Klumpp K, Tsukiyama-Kohara K, El-Gohary A, Sudoh M, Kohara M, *Gastroenerology*, **2013**, 145, 865-73.
16. Mandala, S. M., Rhornton, R. A., Frommer, B. R., Dreikorn, S., Kurtz, M. B., *J. Antibiot.*, 1997, 50, 339.
17. Esumi, T., Iwabuchi, Y., Irie, H., Hatakeyama, S., *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 877-880.
18. Morokuma, K., Takahashi, K., Ishihara, J., Hatakeyama, S., *Chem. Commn.*, **2005**, 2265.
19. Lipshutz, B. H., Kato, K., *Tetrahedron Lett.*, **1991**, 32, 5647.
20. 宿主因子を標的とした新規抗 C 型肝炎ウイルス剤の創薬研究; NA255 誘導体の不斉全合成と構造活性相関 川崎健一、渡辺史郎、増渕みや子、早瀬忠克、小宮山享、福田弘志、村田毅、松原靖昭、小山耕平、小林孝光、進藤英俊、岡本浩一、太田敦徳、坂本洋、勝目朝夫、青木雅弘、青木裕子、新聞信夫、小原道法、須藤正幸、佃拓夫 メディシナルケミストリーシンポジウム、**2004**、2P-23.
21. Hintermann, T., Seebach, D., *Helv. Chim. Acta.*, 81, **1998**, 2093-2126.
22. Campopiano, D. J. *et al.*, *J. Mol. Biol.* **2007**, 370(5), 870-886.

23. (a) Aoki, M., Kato, H., Sudoh, M., Tsukuda, T., Masubuchi, M., Kawasaki, K.; PCT Int. Appl. WO 2004071503. (b) Kawasaki, K., Masubuchi, M., Hayase, T., Komiyama, S., Watanabe, F., Fukuda, H., Murata, T., Matsubara, Y., Koyama, K., Shindoh, H., Sakamoto, H., Okamoto, K., Ohta, A., Katsume, A., Aoki, M., Aoki, Y., Shimma, N., Sudoh, M., Tsukuda, T.. *Bioorg Med Chem Lett.*, **2013**, 23, 336-339.
24. Kato, T., Kimura, N., Mizutani, A., Makino, T., Kawasaki, K., Fukuda, H., Komiyama, S., Tsukuda, T.; PCT Int. Appl. WO 2006088071.
25. Mico, A. D., Margarita, R., Parlanti, L., Vescovi, A., Piancatelli, G., *J. Org. Chem.*, **1997**, 62, 6974-6977.
26. Epp, J., B., Widlanski, T., S., *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 293-295.
27. Schmidt, S., R., *Catalysis of Organic Reactions : Twenty-first Conference*, by CRC Press, **2006**, p119.
28. 報告されている CH4630808 (NA 808) の全合成: (a) Takeuchi, S., Yasuda, S., Kumagai, N., Shibasaki, M., *Angew. Chem Int. Ed.*, **2012**, 51, 4218-4222. (b) Murakata, M., Ikeda, T., *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, 15, 6632-6639.
29. Iwabuchi, Y., *Chem. Pharm. Bull.*, **2013**, 61, 1197.
30. Shibuya, M., Sasano, Y., Tomizawa, M., Hamada, T., Kozawa, M., Nagahama, N., Iwabuchi, Y., *Synthesis*, **2011**, 3418.