

アルドースリダクターゼ (AR) 阻害薬：(-)-ラニレスタットの 光学活性中間体の新規・光学選択的合成プロセス及び その HPLC 光学純度評価法の開発

西 博行・生中 雅也・西村 良夫

Development of the Novel Stereoselective Synthetic Process for an Optically Active Intermediate of (-)-Ranirestat: Aldose Reductase Inhibitor and its Optical Purity Testing Method by HPLC

Hiroyuki NISHI, Masaya IKUNAKA and Yoshio NISHIMURA

1. はじめに

医薬品開発の初期段階（探索・非臨床試験など）では、必要とされる原薬量は比較的少量でよく、様々な合成法や原料・試薬・触媒等を駆使して製造され、薬理・毒性試験等に原薬が供される。しかし、開発ステージが進化した臨床試験後半（Phase 2b および Phase 3）では、コマーシャルベースでの製造を見据え、スケールアップ製造法を開発する必要が生じる。これを担当するのが、医薬品メーカーでは CMC (chemistry, manufacturing and control) と呼ばれる研究ユニットの、プロセス化学部門である^{1,2)}。ここでは、探索や合成研究部門で開発・実施された初期の製造法の見直しが行われ、より安全で効率かつ品質よく製造ができるような合成法の開発、いわゆるプロセス化学研究が行われる。また、場合によっては他社の特許回避のための合成ルートの検討も要求される。一方、CMC 研究ユニットの品質評価部門では、合成法が確立されるのにあわせ、分析法バリデーション^{3,4)}を取得し、これら医薬品候補の「規格および試験方法」が設定される。製剤研究部門では、体内動態研究から、最適な服用方法と剤形の決定が行われ、あわせて商業生産の検討が進められる。最終製剤の選定に合わせ品質評価部門では、原薬と同様に、製剤の「規格および試験方法」が設定される。

医薬品、特に低分子の合成医薬品では、構造中に不斉炭素有し、光学異性体が存在するケースが多い。このような場合、薬効・毒性面から医薬品は光学活性体で開発されることがほとんどである⁵⁾。初期の必要原薬が少量でよいときは、カラムクロマトグラフィーによる光学分割での供給が行われることもある。しかし、分離を用いる本法はコストもかかりスケールアップには向かずであり、一般的にはより効率のよい BINAP に代表される不斉触媒等を利用する光学選択的な合成ルートが検討される⁶⁻⁹⁾。生体では酵素がその役割を担うことが多いが、有機合成反応においても不斉触媒として酵素の応用が検討されている¹⁰⁻¹³⁾。

安田女子大学薬学部薬学科創薬学講座合成化学分野では、アルドースリダクターゼ (AR) 阻害薬であるラニレスタット (図 1) の光学活性中間体の合成プロセスにつき、リパーゼ触媒を用いる非対称化反応の検討が行われている。一方、分析化学分野では、合成化学分野と共同してそ

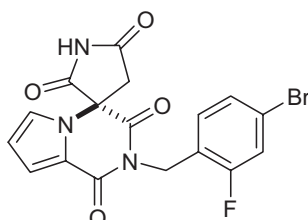


図1 ラニスタットの構造式

のエナンチオマー評価法の開発研究を行っている。本論文では、ラニスタットの光学活性中間体につき、キラル HPLC を用いた評価法の検討を行った結果について報告する。なお、ラニスタットは、糖尿病合併症薬として臨床開発中で、日本では大日本住友製薬(株)が開発を進めており、2013年9月現在、糖尿病合併症を適応症として Phase 3 段階に入っている¹⁴⁾。また、本薬物の光学選択的な合成法に関する報告も多い^{13,15-18)}。

2. ラニスタット光学活性中間体の合成プロセス

ラニスタットの合成プロセスのうち、リパーゼ触媒を用いた非対称化反応の合成ルートを図2に示す。本プロセスは、出発原料から4ステップ目にあたる。モノアセチル体とジアセチル体が生成するが、前者が主生成物である。

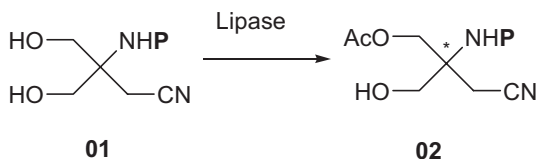


図2 リパーゼ触媒による光学選択的アセチル化反応 (P: 保護基)

3. 実 験

3.1 装置・試薬

HPLC 装置には、ポンプとして(株)島津製作所製 LC-20AD, 検出器として, UV・VIS 検出器 SPD-20A を用い, 室温 (25°C) で分析を行った。検出波長は 265 nm とし, 試料注入は, レオダイン社製 7725i インジェクター (20 μL の試料ループ付) を用いて, ハミルトン製マイクロシリレンジにより, 10 μL の一定量の試料を注入した。溶媒としては, 和光純薬(株)製の HPLC 用 n-ヘキサン, イソプロパノール, 特級のエタノール (99.5%) を用いた。流量は 1.0 mL/min, 分析時間は30分とし, インテグレート島津 C-R8A により, データ取得を行った。

HPLC によるエナンチオマー分離法には多くの手法があるが, キラルカラムを用いる方法が最も汎用されている^{19,20)}。特にキラル部位として多糖類誘導体を用いたものは, 多様なものが開発されており, 多くの種類のキラルカラムが利用できる²¹⁾。今回は, カラムとしてダイセル化学工業(株)製の, 順相系多糖類型キラルカラム CHIRALCEL シリーズ 3 種類 (AD-H, AS-H, AY-H) と CHIRALPAK シリーズ 6 種類 (OD-H, OJ-H, OZ-H, IA, IB, IC), いずれも 4.6 mm

内径で、カラム長さは 15 cm あるいは 25 cm のものを用いた。

3.2 試料

生成物 (図 2 の化合物 02) については、その光学選択性を評価する必要がある。まず、リパーゼを用いずに反応を行い、ターゲット生成物のラセミ体を合成して、HPLC 分析の標品とした。しかし、化合物 02 には特異的な UV 吸収部位がないため、HPLC 分析での UV 検出器によるピーク検出が困難であった。そこで、この化合物の水酸基に対し、*t*-Butyl diphenylchlorosilane (TBDPSCI) を用いてシリル化を行い、HPLC 分析に供した。反応式を図 3 に示す。本反応の収率は 87~98% で、ほぼ定量的に進行した²²⁾。

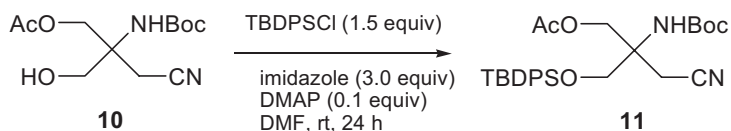


図 3 TBDPSCI によるシリル化反応

上記の化合物 10 では、アミノ基の保護基 P として、化合物の安定性の面から *t*-Butoxycarbonyl (Boc) 基を用いたが、Benzyloxycarbonyl (Z) 基を用いた化合物の TBDPS 化したもの (化合物 14) のラセミ体も合成し、HPLC 分析に供した。さらに化合物 11 のニトリル基を加水分解したアミド体 (化合物 15) も合成し、HPLC 分析に供した。なお、試料は 1 mg/mL になるように移動相 (ヘキサン/エタノール (95:5)) で溶解したものをを用いた。



図 4 HPLC 分析に供したラセミ化合物

3.3 光学活性中間体の評価法

試料数 mg を精密にはかり、移動相に溶かし、約 1 mg/mL 溶液として、試料溶液とする。試料溶液 10 μ L につき、以下の条件で液体クロマトグラフィー <2.10> に従って、試験を行い、面積百分率法により、光学純度を測定する。

操作条件

検出器：紫外可視吸光度計 (測定波長：265 nm)

カラム：ダイセル CHIRALPAK IC (内径 4.6 mm, 長さ 25 cm)

カラム温度：室温 (約 25°C)

移動相：ヘキサン・エタノール混液 (19:1)

流量：1.0 mL/min

カラムの選定：上記の化合物 11 のラセミ体の試料 (約 1 mg/mL 移動相) 溶液 10 μ L につき、上記条件で分析するとき、エナンチオマーが完全分離するカラムを用いる。

4. 結果および考察

4.1 キラル HPLC によるエナンチオマー分離

化合物11のラセミ体につき、移動相としてヘキサンをベースに極性溶媒としてエタノールあるいはイソプロパノールを添加した混液を用いて、エナンチオマーの識別について基礎検討を行った。その結果、用いたキラルカラムの中でAD-H, OD-H, OZ-HおよびIB, ICで、比較的良好に光学認識されることがわかった。後者のIBおよびICカラムは、前3種類のカラムの耐溶剤タイプとして開発されたカラムで、OD-HとIBとは、同じキラル部位を持つ。固定相のキラル部位を図5に示す。

固定相に使用されている多糖類誘導体についてみると、母骨格の多糖類はAD-Hがアミロース、OD-H, OZ-H, IB, ICがセルロースであり²¹⁾、上記の結果より、光学認識に対してこの違いの寄与は小さいものと推定された。一方、多糖類のグルコースユニットの2, 3および6に導入された置換部位をみるとOZ-Hを除き、いずれも3,5-ジメチルフェニルカルバメート(AD-H, OD-H, IB), あるいは3,5-ジクロロフェニルカルバメート(IC)であった。これらはいずれもフェニル基の3,5位にかさ高い置換基があり、この構造が識別に有効に働いたものと考えられた。

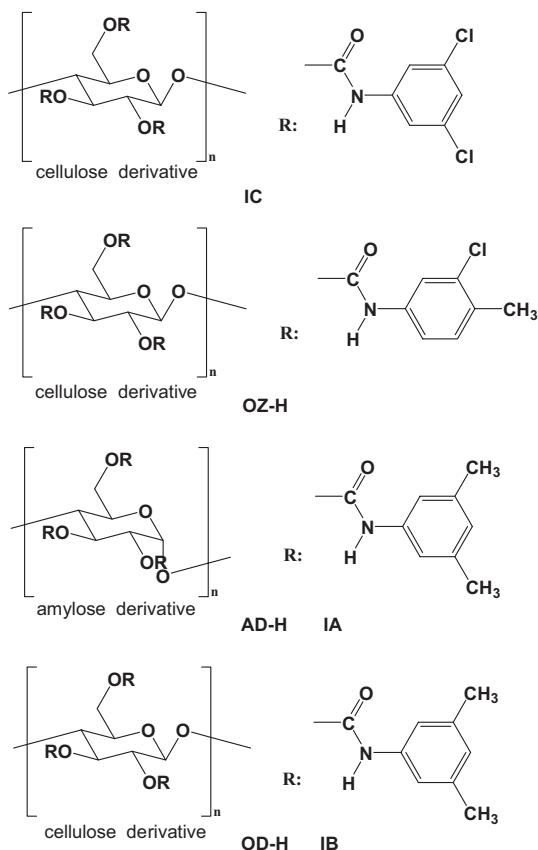
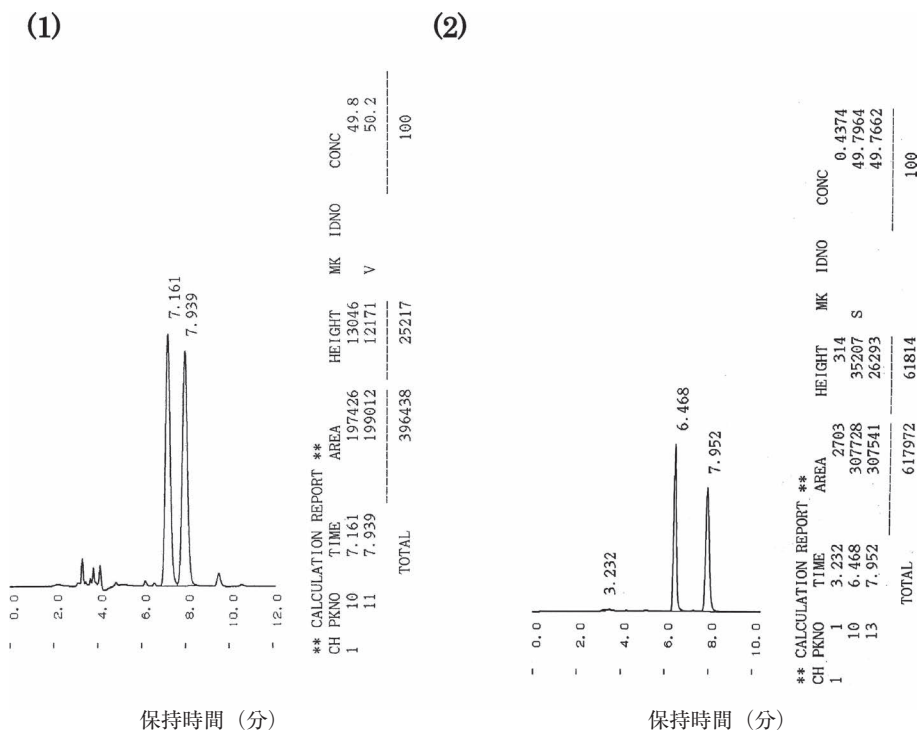


図5 光学認識能を示した固定相のキラル部位

そこで、AD-H, OD-H および IC カラム (いずれも、内径 4.6 mm, 長さ 25 cm) につき、化合物11に加え、化合物14および化合物15のエナンチオマー識別についても検討を行った。まず、AD-H カラムを用い、移動相にヘキサン/エタノール (90:10) を用いて、流量 1.0 mL/min で分析を行った。その結果、化合物11は、4.11分、4.59分に ($\alpha=1.32$)、化合物14は8.89分、20.8分に ($\alpha=2.89$) 溶出し、ベースライン分離された (アミド体は溶出が遅く、データ未取得)。本カラムでの識別能 (α) は大きいものであったが、ピークの理論段数 N が低く (2000~3000段)、そのため2番目に溶出するエナンチオマーピークは極めてブロードであった。以上より、AD-H カラム (アミロース, 3,5-ジメチルフェニルカルバメート) は、識別には優れていたもの、迅速分析、あるいは品質試験には不向きと判断された。

次に同じ組成の溶媒、ヘキサン/エタノール (90:10) を用いて、OD-H カラム (セルロース, 3,5-ジメチルフェニルカルバメート) で分析を行った。化合物11は、3.80分、3.92分に ($\alpha=1.10$)、化合物14は5.88分、6.17分に ($\alpha=1.09$) 溶出し、また、アミド体は5.17分と5.34分と両者の間に溶出した。ピーク形状はAD-Hと比較して良好 (N , 4200段)であったが、いずれも分離は不十分であった。そこで、極性溶媒の比率を低くした、ヘキサン/エタノール (95:5) を用いて化合物11を分析したところ、7.16分と7.94分 ($\alpha=1.16$) で、ベースライン分離 (分離度 $R_s=1.8$) した。図6(1)に分離例を示す。化合物14は、1番目のエナンチオマーピークのみが30分以内 (約25分) に溶出した。

最後に IC カラム (セルロース, 3,5-ジクロロフェニルカルバメート) を用い、移動相ヘキサ



カラム：(1) OD-H カラム, (2) IC カラム (その他の条件は3.3参照)

図6 化合物11のエナンチオマー分離

ン／エタノール（95：5）を用いて化合物11および化合物14を分析した。化合物11のクロマトグラムを図6(2)に示す。OD-Hカラムと比較し、保持時間が早いにもかかわらず十分分離 ($\alpha=1.42$, $R_s=5.7$) しており、かつ理論段数も高く（10000段）、もっとも本化合物の光学純度評価に適していると考えられた。なお、化合物14は、同条件で約11.9分と13.8分に溶出した。

そこで、移動相条件の溶出力を高めたヘキサン／エタノール（80：20）を用いて、アミド体を含めた3種類のラセミ体の分離を行った。結果を図7に示す。本条件では、化合物11が4.10分、4.39分に、化合物14は5.02分、5.33分に、アミド体は7.91分と8.91分に溶出し、3種類の一斉エナンチオマー分離が可能であった。なお、図6のクロマトグラムでは、溶液状態で保管していた3種類のラセミ体の分解物と推定される幾つかのピークが認められた。

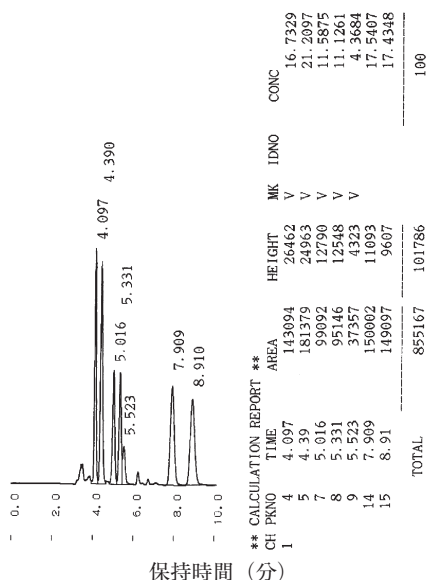


図7 ICカラムによる3種類のラセミ体の一斉エナンチオマー分離
カラム：IC，移動相：ヘキサン／エタノール（80：20）。他は図5と同じ

以上より、保持時間のある程度とってこれらと分離させる、すなわち、図6(2)の条件が適していると判断され、不斉反応の評価（光学純度測定）にこの条件を用いることとした。

なお、ICカラムとその他のAD-HおよびOD-Hカラムを用いて分離の検討を行っている過程において、後者のカラムで同じ移動相を用いても再現性が悪く、保持時間が短くなる傾向が認められた。これは固定相の履歴によるもの、すなわち、本カラムの製造（コーティング）によるものと推定された。この結果より、耐溶媒カラムとして開発されている、キラル部位が固定相に化学結合されているICカラムが優れていることが確認された。

4.2 キラルHPLCによる光学選択的反応の評価

上記図2の反応における生成物の評価を3.3記載の方法に従って行った。結果の一部²²⁾を表1に示す。反応条件を様々に変えて検討したところ、生成物はいずれも光学選択的に誘導され、そ

の ee はほぼ90%であった。また、図8にその時の試料溶液から得られたクロマトグラム²²⁾の例を示す。図では主生成物は、前に溶出するエナンチオマーであることが分かった。詳細な分析法バリデーションは取得していないが、本手法により0.1%のマイナーエナンチオマーの評価が可能であり、プロセス化学研究の評価に有用であることが示された。

表1 リパーゼ触媒を用いる非対象化反応の結果²²⁾

| 反応 | 反応溶媒 | 反応時間 (h) | 化合物10 収率 (%) | 化合物11 ee (%) |
|----|----------------|----------|--------------|--------------|
| 1 | ジイソプロピルエーテル | 3 | 48 | 94 |
| 2 | テトラヒドロフラン | 144 | 75 | 89 |
| 3 | シクロペンチルメチルエーテル | 24 | 68 | 88 |
| 4 | 酢酸エチル | 24 | 83 | 89 |
| 5 | 酢酸イソプロピル | 24 | 83 | 91 |

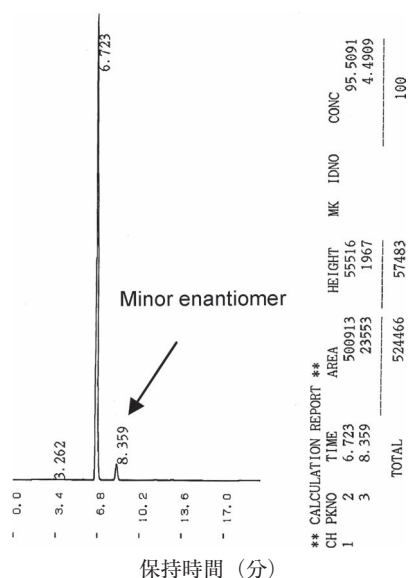


図8 IC カラムを用いた合成中間体の光学選択性評価のクロマトグラム例

5. おわりに

IC カラムを用いるキラル HPLC 法により、ラニレスタット合成プロセスのうち、リパーゼ触媒を用いた非対象化反応の、光学選択性評価が可能となった。目的とする (-) ラニレスタットの全合成までには、今回評価した中間体からさらに多くの合成ステップを経る。これら中間体、また、最終のラニレスタットについても光学純度の評価が要求されるが、今後、キラル HPLC 法により検討を進める予定である。

参 照 文 献

- 1) 西 博行, 「CMC 研究とクロマトグラフィー」, *LCtalk*, vol. 66(10), 2 (2007).
- 2) 鴻池敏郎, 「CMC 研究における化学の役割」, *化学と工業*, 60(6), 599-600 (2007).
- 3) ICH guidelines Q2A and Q2B, <http://www.pmda.go.jp/ich/quality.htm>
- 4) 日本薬局方第十六回改正・参考情報 G1 (2011), <http://jpdbs.nihs.go.jp/jp16/>
- 5) 村高尚道, 「光学活性医薬品開発とキラルプロセス化学技術 第1部第2章光学活性医薬品の開発動向」, *サイエンス&テクノロジー*, 23-35, (2011).
- 6) R. Noyori, *Adv. Synth. Catal.*, 345, 15-32 (2003).
- 7) S. Akutagawa, *Topics in Catal.* 4(3,4), 271-274 (1998).
- 8) R. Noyori, T. Ikeda, T. Ohkuma, M. Widalm, M. Kitamura, H. Takaya, S. Akutagawa, N. Sayo, T. Saito, T. Takemoto, H. Kumobayashi, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 9134 (1989).
- 9) W. Kuriyama, Y. Ino, O. Ogata, N. Sayo, T. Saito, *Adv. Synth. Catal.*, 352, 92 (2010).
- 10) H. Matsumae, M. Furui, T. Shibatani, T. Tosa, *J. Ferment. Bioeng.*, 78(1), 59-63 (1994).
- 11) H. Matsumae, M. Furui, T. Shibatani, *J. Ferment. Bioeng.*, 75(2), 93-98 (1993).
- 12) 松前裕明, *化学工業*, 54(2), 128-136 (2003).
- 13) T. Sugai, T. Kurihara, T. Takeda, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, JP2013110980 A20130610 (2013).
- 14) 大日本住友製薬(株) ホームページ <http://www.ds-pharma.co.jp/index.html>
- 15) T. Mashiko, K. Hara, D. Tanaka, Y. Fujiwara, N. Kumagai, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, 129(37), 11342-11343 (2007).
- 16) T. Mashiko, N. Kumagai, M. Shibasaki, *Org. Lett.*, 10(13), 2725-2728 (2008).
- 17) R. He, K. Maruoka, *Synthesis*, 13, 2289-2292 (2009).
- 18) B. M. Trost, M. Osipov, G. Dong, *Org. Lett.*, 12(6), 1276-1279 (2010).
- 19) S. Ahuja Ed., C. W. Amoss, N. M. Maier, chapter3 in "Chiral separation methods for pharmaceutical and biotechnological products", WILEY (2011).
- 20) 西 博行, 「光学活性医薬品開発とキラルプロセス化学技術 第3部第3章光学異性体の分析と不純物の工程管理」, *サイエンス&テクノロジー*, 235-247, (2011).
- 21) DAICEL CHIRAL COLUMNS キラルカラム総合カタログ vol. 5, タイセル化学工業(株)。
- 22) 西村良夫, 生中雅也, (-)-ラニレストットの光学活性中間体の新規・選択的光学活性合成プロセス, 未発表データ。

Summary

Recently most of pharmaceuticals having asymmetric center, have been developed as a single enantiomer, because of its activity and toxicological aspect. In the laboratory of synthetic and biological chemistry, faculty of pharmacy, in Yasuda Women's University, lipase is investigated as a catalysis for the synthesis of the optically active intermediates of (-)-Ranirestat, which is one of aldose reductase inhibitors under the clinical investigation (Phase 3, in 2013). Therefore for the evaluation of its enantioselectivity, optical purity testing method of the intermediates is required. In the laboratory of analytical chemistry, in cooperation with the laboratory of synthetic and biological chemistry, development of the chiral HPLC method is investigated. Among 9 commercially available chiral columns, which have polysaccharide derivative as a chiral moiety, CHIRAL-PAC IC column shows the best enantioselectivity for the target intermediate. Enantiomers were separated within 10 min with theoretical plate number ca. 10000, employing a mixture of n-hexane and ethanol (19:1) as a mobile phase. In this case, major enantiomer eluted before the minor enantiomer and it was found ca. 0.1 % minor enantiomer can be detectable in the method. Minor

enantiomer in some trial synthesis of the intermediate detected by the chiral HPLC method was 3–6 %, indicating the synthetic process employing lipase gave ca. 90% ee.

[2013. 9. 26 受理]