

博士論文

**S1P₁ アゴニスト作用に基づく新規免疫抑制薬
の探索研究**

2015年 3月

東京薬科大学

辻 貴司

**Exploring studies of novel S1P₁ agonists for
discovering the immunosuppressive agents**

March 2015

Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences

Takashi Tsuji

目次

第 1 章 緒言

第 1 節	免疫抑制薬の現状	1
第 2 節	fingolimod (FTY720)	3
第 3 節	スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) と S1P 受容体 (S1P _x)	5
第 4 節	fingolimod の作用機序	6
第 5 節	研究成果の概略	8
第 6 節	結語	13

第 2 章 2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールの酵素を用いた不斉非対称化反応

第 1 節	序論	14
第 2 節	リパーゼを用いた不斉非対称化反応	17
第 3 節	S1P ₁ アゴニスト中間体合成	22
第 4 節	α -Methyl Garner's Aldehyde 合成	24
第 5 節	結語	25

第 3 章 キラルな α,α -二置換 α -アミノアルコール構造を有するホスホニウム塩の創製

第 1 節	序論	27
第 2 節	アミノアルコールユニットを有するホスホニウム塩と α,α -二置換アミノ酸構造を有する生理活性物質	28
第 3 節	ホスホニウム塩合成	30
第 4 節	Wittig 反応条件検討	33
第 5 節	基質一般性検討	35
第 6 節	生理活性物質合成への応用	39
第 7 節	結語	40

第 4 章 微生物変換を利用した α,α -二置換 α -アミノアルコール化合物の効率的リン酸エステル化法

第 1 節	序論	42
第 2 節	鍵中間体を用いたアミノアルコール合成	44
第 3 節	化学的リン酸エステル体合成法	46
第 4 節	微生物を利用したリン酸エステル化法	47
第 5 節	微生物を用いたアミノアルコール体からのリン酸エステル体合成	48

第 6 節 結語	53
第 5 章 短半減期型 S1P ₁ アゴニストを志向したエーテル化合物の探索研究	
第 1 節 序章	54
第 2 節 エーテル化合物について	57
第 3 節 アミノアルコール体合成	58
第 4 節 リン酸エステル体合成	61
第 5 節 構造活性相関 (SAR) 研究	62
第 6 節 結語	69
第 6 章 結論	71
実験の部	76
第 2 章に関する実験	77
第 3 章に関する実験	90
第 4 章に関する実験	106
第 5 章に関する実験	113
参考文献	128
論文目録	137
参考論文目録	138
謝辞	139

略語

Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
Alloc	allyloxycarobonyl
PCC	pyridinium chlorochromate
MS4A	molecular sieves 4A
KOH	potassium hydroxide
Na ₂ S ₂ O ₃	sodium thiosulfate
DMSO	dimethylsulfoxide
TBAF	tetra <i>n</i> -butylammonium fluoride
DMAP	dimethylaminopyridine
TFA	trifluoroacetic acid
Pd-C	palladium on charcoal
DMPU	<i>N,N'</i> -dimethylpropyleneurea
<i>m</i> CPBA	<i>m</i> -chloroperoxybenzoic acid
<i>t</i> -BuOOH	<i>tert</i> -butyl hydroperoxide
<i>p</i> -TsOH	<i>p</i> -toluenesulfonic acid (= PTSA)
<i>p</i> -TsCl	<i>p</i> -toluenesulfonyl chloride (= TsCl)
NaH	sodium hydride
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HEPES	<i>N</i> -[2-hydroxyethyl]piperazine- <i>N'</i> -[2-ethanesulfonic acid]
GDP	guanosine 5'-diphosphate
DTT	1,4-dithio-DL-threitol
Val	valine
Leu	leucine
Arg	arginine
Phe	phenylalanine
Glu	glutamic acid
Ile	isoleucine
EC ₅₀	half maximal (50%) effective concentration
ID ₅₀	half maximal (50%) infectious dose
SphK	sphingosine kinase
CYP	cytochrome P450
Rpm	rotation per minutes

第 1 章 緒言

第 1 節 免疫抑制薬の現状

ヒトを始めとする高等生物からアメーバー等の下等生物まで、生体が生命活動を維持していく上で免疫応答は必要不可欠である。生体内では、病原微生物などの有害な非自己成分（外来異物）から生体（自己細胞）を守るため、マクロファージや好中球などの食細胞に加え、非自己成分の認識、排除を担うリンパ球などの免疫細胞が免疫反応に関与している（Figure 1-1_a）。この生体を外敵から守る免疫応答機構は生体内のシステムが複雑に絡み合っており、そのバランスが崩れることは様々な疾患に繋がることが知られている。¹⁾

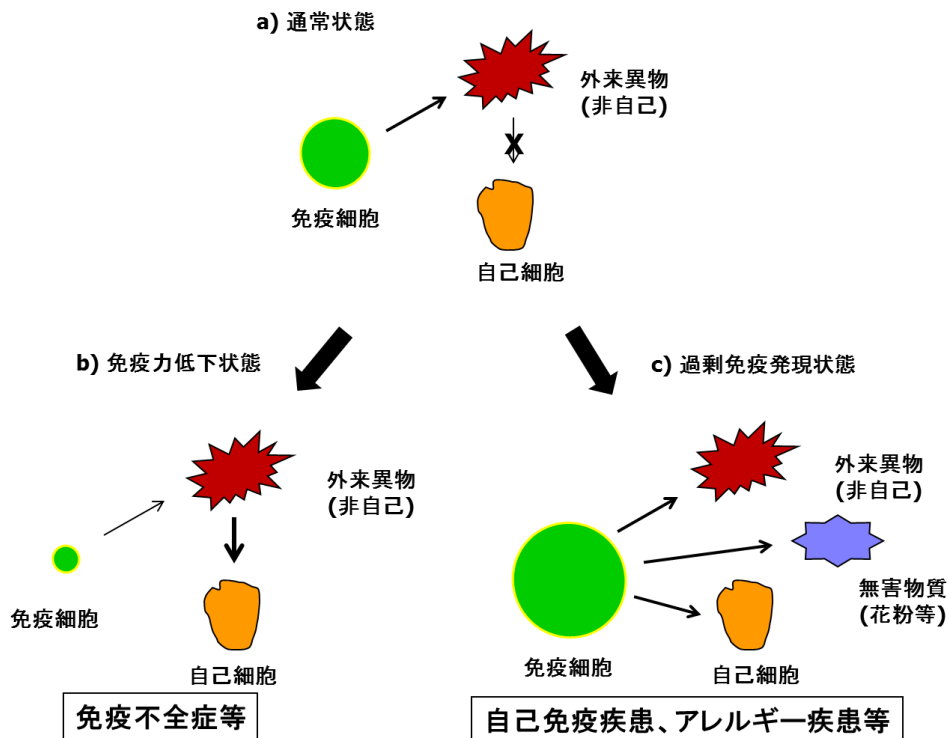


Figure 1-1. Correlation between immune reactions and diseases.

例えば、免疫活性が低下すると外来異物から生体（自己細胞）を守れなくなり、その結果、様々な症状を引き起こすようになる（Figure 1-1_b）。この免疫活性が低下した状態は免疫不全症と呼ばれる。免疫不全症は、先天的に免疫活性が低下している原発性免疫不全症と、後天的に免疫活性が低下する続発性（後天性）免疫不全症とに分類され、リンパ球や、マクロファージなどの免疫担当細胞のいずれかが機能欠損や、機能低下を起こすことが原因とされる。代表的な疾患には、ヒト免疫不

全ウイルス（HIV）感染症による後天性免疫不全症候群（AIDS）やガンなどが挙げられる。一方、免疫系が過剰に活性化した場合にも様々な疾患を誘発することが知られている（Figure 1-1_c）。例えば、リンパ球の自己、非自己の認識不足により免疫系が自己成分に対して攻撃を加えるようになる自己免疫疾患や、本来無害である物質に対しても過剰な免疫応答をすることにより生じる様々なアレルギー疾患などがそれに含まれる。代表的な疾患には、関節リウマチ、乾癬、アトピー性皮膚炎、気管支喘息などが挙げられる。また、炎症性腸疾患や全身性エリテマトーデス（SLE）といった難治性疾患²⁾も自己免疫疾患の一種であり、免疫系の過剰な活性化が原因であると言われている。¹⁾

上記した免疫関連疾患の中でも、特に、過剰な免疫応答が原因と言われる患者数は年々増加傾向にあり、またその患者層も小児から高齢者まで多岐に渡っており、早急な対策が求められている。事実、免疫関連疾患に対しては国を挙げての精力的な施策が講じられている。³⁾

免疫関連疾患の治療には、従来、過剰な免疫反応によって生じる炎症反応を抑制する目的でステロイドなどの抗炎症薬が広く使用されてきたが、その治療法は対症療法に過ぎず根本的治療ではなかった。免疫関連疾患の治療、予防という観点では免疫応答を抑制する薬剤である免疫抑制薬が有効とされ、今日まで多くの薬剤が開発、上市されている。Figure 1-2 に現在使用されている代表的な免疫抑制薬を示す。

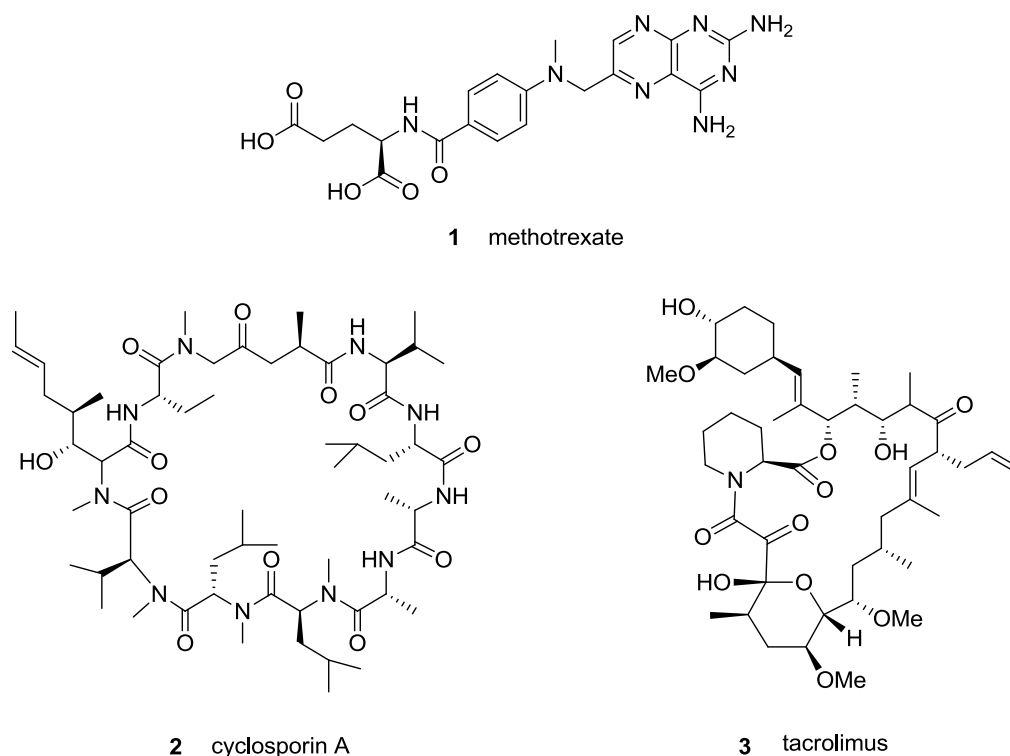


Figure 1-2. Major immunosuppressants.

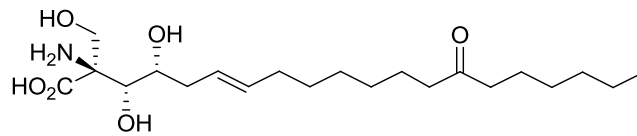
この他にも多くの薬剤が免疫抑制薬として上市されているが、その作用機序は単一ではなく、薬剤によって異なる。例えば、代謝拮抗薬として機能するメトトレキセート **1**⁴⁾ は DNA 合成阻害によりリンパ球の増殖を抑制することで免疫抑制作用を示す薬剤であり、主に関節リウマチや白血病などの治療に用いられている。また、T細胞機能抑制薬であるシクロスポリン A **2**⁵⁾ やタクロリムス **3**⁶⁾ は共にカルシニューリン阻害剤と呼ばれ、ヘルパーT細胞のインターロイキン 2 (IL-2) 産生を抑制することで免疫抑制作用を示す。このカルシニューリン阻害剤は、主に骨髄や臓器移植時に用いられる他、関節リウマチ、アトピー性皮膚炎にも適応されている。⁷⁾

このように、現在市販されている免疫抑制薬は免疫関連疾患の治療に効果的であり、幅広く用いられている一方、そのほとんどは免疫系の細胞自体に作用する薬剤であるが故、副作用も重篤である場合が多い。例えば、現在最も広く使用されているカルシニューリン阻害剤として作用する免疫抑制薬（シクロスポリン A、タクロリムスなど）は、肝臓や腎臓への機能障害などの副作用⁸⁾ が報告されており、その使用に際しては厳密な管理下で行われる必要がある。

近年では、免疫関連研究の進展に伴い、従来の免疫抑制薬に見られた重篤な副作用を持たない新規治療薬として多くの生物製剤が開発、上市されており、関節リウマチなどの治療に期待が持たれている。⁹⁾ しかしながら、生物製剤は安全性に優れている一方で、その価格面や、取扱いの面で問題点を抱えており、依然として自己免疫疾患分野における医療満足度は低い。さらに、本疾患領域は患者数の増加と生物製剤の台頭に相俟って市場が増加傾向にあり、医療満足度、市場性の両面から、安全性に優れ、臨床現場で使用し易い低分子免疫抑制薬の開発が強く期待されると言える。

第 2 節 fingolimod (FTY720)

1990 年、藤多らは古来より中国で生薬として用いられている冬虫夏草の一種であるタイワンツクツクハウシを宿主とする菌 *Isaria sinclairii* の培養濾液より強い免疫抑制作用を有する物質を単離し、ISP-1 (immunosuppressant product-1) と命名した。その後、ISP-1 の化学構造分析が行われた結果、1972 年にカビの仲間である *myriococcum* から発見されていた **myriocin 4** と呼ばれる抗真菌抗生物質と同一の化合物であることが判明した (Figure 1-3)。¹⁰⁾

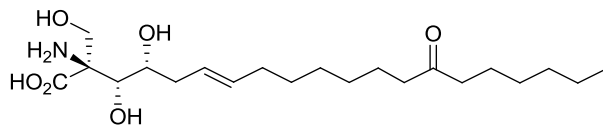


4 myriocin (ISP-I)

Figure 1-3. Structure of myriocin (ISP-1) 4.

Myriocin の免疫抑制作用は、*in vitro* の免疫抑制作用測定試験として多用される混合リンパ球反応（MLR）試験において、シクロスポリン A よりも強力な活性である一方、その作用機作はシクロスポリン A とは全く異なる物であった。すなわち、カルシニューリン阻害剤であるシクロスポリン A やタクロリムスはヘルパー T 細胞における IL-2 などのサイトカイン産生を抑制することで免疫反応を抑制するのに対し、新たに見出された myriocin は拒絶反応に直接関わる細胞障害性 T 細胞やナチュラルキラー細胞（NK 細胞）に対してアポトーシスを引き起こすことで免疫抑制活性を発現することが見出された。¹¹⁾

強力な免疫抑制作用を有する myriocin であったが、毒性が強く実用化にはほど遠いものであることが判明したため、その後、毒性軽減を目的とした myriocin の化学修飾が行われることになった（Figure 1-4）。その結果、myriocin の構造を簡略化した 2-アミノ-1,3-プロパンジオール構造が免疫抑制作用発現に必須であることが示唆され（5）¹²⁾、さらなる構造最適化によって FTY720（fingolimod）6 が見いだされるに至った。¹³⁾



4 myriocin (ISP-I)

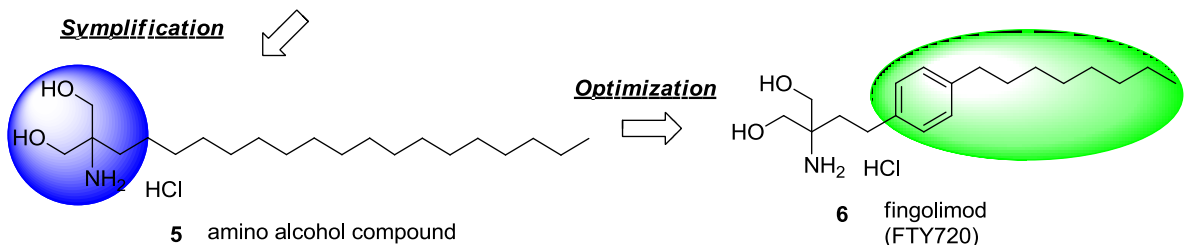


Figure 1-4. Optimization of myriocin structure.

驚くべきことに、誘導體展開の過程において、fingolimod の示す免疫抑制作用は、myriocin が有する SPT 阻害活性に基づく T 細胞に対するアポトーシス誘導作用とは異なり、リンパ球ホーミング（回帰）作用に基づくものへと変化していることが明

らかとなった。¹⁴⁾ 以下にリンパ球ホーミング作用について説明する (Figure 1-5)。

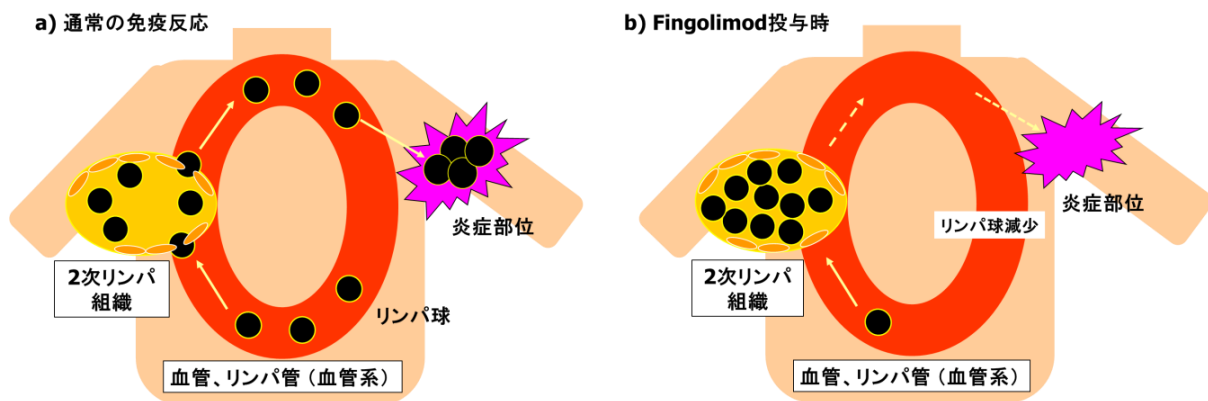


Figure 1-5. Mechanism of peripheral blood lymphopenia.

通常、骨髄や胸腺などの一次リンパ組織で生産されたリンパ球は、血管系を介してパイエル板、リンパ節、脾臓などの二次リンパ組織に移行した後、血管を通じて全身を循環し、免疫反応部位に集積するという性質を有している (Figure 1-5_a)。このように、生体内ではリンパ球が体内を循環し、必要な部位に働きかけることで免疫応答を示している。一方、fingolimod が投与されると、リンパ球がリンパ節などの二次リンパ組織内に隔離 (リンパ球ホーミング) された状態になり、末梢血中の循環リンパ球の著しい減少がおこる。循環リンパ球が減少することで免疫反応部位へのリンパ球の浸潤量が減少し、その結果、免疫反応が抑制される (Figure 1-5_b)。本反応はこれまでの免疫抑制剤の作用機作にはない特徴的なものであったが、fingolimod 発見当初、その強力なリンパ球ホーミング作用の作用機作については不明のままであった。

第 3 節 スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) と S1P 受容体 (S1P_x)

Fingolimod がメカニズム不明の新規免疫抑制薬として発見される傍ら、リゾリン脂質の一種として体内に存在するスフィンゴシン-1-リン酸 (Sphingosine-1-phosphate:S1P) **8** についても、その機能解明に向けた研究が進められていた。¹⁵⁾ 今日では、リン酸化酵素であるスフィンゴシンキナーゼ (SphK) の働きによりスフィンゴシン **7** から生成する S1P **8** が、生体内で様々な生理活性を持つ重要な脂質メディエーターとしての役割を有することが知られているが、それが判明したのは 1990 年代に入ってからであった。¹⁶⁾ 1998 年、H1a らにより、S1P **8** が血管内皮分化遺伝子 (Endothelial Differentiation Gene: EDG) としてクローニングしていた G タンパク共

役型受容体（G-protein-coupled receptor: GPCR）の生体内リガンドであることが報告された。¹⁷⁾ この GPCR は発見当初 Edg 受容体と呼ばれていたが、その後新たに、S1P 受容体（Sphingosine-1-phosphate receptor）と呼称されるようになり、現在までに S1P₁（Sphingosine-1-phosphate receptor 1）から S1P₅（Sphingosine-1-phosphate receptor 5）まで 5 種類のサブタイプが見出されている（Figure 1-6）。¹⁸⁾

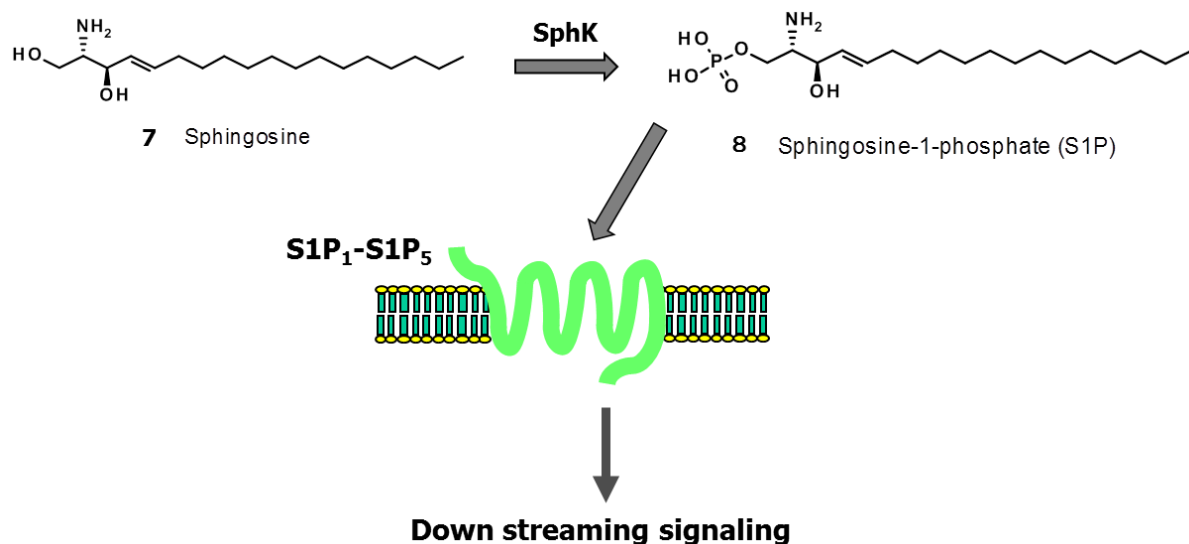


Figure 1-6. Sphingosine-1-phosphate (S1P) and their receptors (S1P_x).

7回膜貫通型タンパク質である5種類のS1P受容体は、サブタイプによって発現部位は大きく異なる。すなわち、S1P₁、S1P₂、S1P₃は比較的広範な組織・細胞で発現しているのに対し、S1P₄、S1P₅はそれぞれ造血・リンパ球系と神経系に主に発現していることが知られている。近年、各S1P受容体の生体内で担っている機能については、S1P受容体のノックアウト（KO）マウスを用いた実験等により徐々に解明されつつある。中でもS1P₁については様々な生命現象において重要な役割を担っていることが明らかにされており¹⁹⁾、後に、このS1P₁がfingolimodの免疫抑制作用発現メカニズムに大きく関与していることが判明することとなる。

第4節 fingolimod の作用機序

お互いに独立した研究対象であったfingolimodとS1P受容体であったが、2002年、Merck及びNovartisの研究者によりfingolimodの薬効発現はS1P受容体へのアゴニスト作用によるものであることが報告された（Table 1-1）。²⁰⁾ すなわち、fingolimod 6は生体内に投与された後、血中でスフィンゴシンキナーゼ（SphK）の働きにより

速やかにリン酸化され、リン酸エステル体 **6-P** へと変換されたのち、**S1P₂** を除く他の **S1P** 受容体に対し非選択的にアゴニスト作用を示すことにより免疫抑制作用を示すことが明らかとされた。また、その活性は内在性リガンドとして機能している **S1P 8** と同様に非常に強力なものであった。

Table 1-1. Binding affinity to S1P receptors.^a

CCCCCCCCc1ccc(cc1)CCN(CO)CO
6 fingolimod

$\xrightarrow{\text{SphK}}$

CCCCCCCCc1ccc(cc1)CCN(COP(=O)(O)O)CO
6-P fingolimod-P

Compound	EC ₅₀ (nM)				
	S1P ₁	S1P ₂	S1P ₃	S1P ₄	S1P ₅
8 (S1P)	0.47	0.31	0.17	95	0.61
6 (fingolimod)	300	>10000	>10000	>5000	2600
6-P (fingolimod-P)	0.21	>10000	5.0	5.9	0.59

^a Binding affinity to each S1P receptor was calculated by GTPγ-S binding assay and the details are shown in experimental section.

今日では、5種類存在する **S1P** 受容体のうち、**S1P₁** へのアゴニスト作用がリンパ球ホーミング作用を誘導することが判明しており、次のような作用機序が提唱されている (Figure 1-7)。²¹⁾ まず、生成したリン酸エステル体 **6-P** が Tリンパ球上に存在する受容体 **S1P₁** にアゴニストとして作用し、**S1P₁** を細胞表面から内在化させる (機能的アンタゴニスト)。細胞膜上から **S1P₁** を失った Tリンパ球は、**S1P₁** の生体内リガンドである **S1P** の濃度勾配を感知できなくなり、二次リンパ組織から血中への移行が阻害される。その結果、末梢血中の Tリンパ球が減少するというものである。

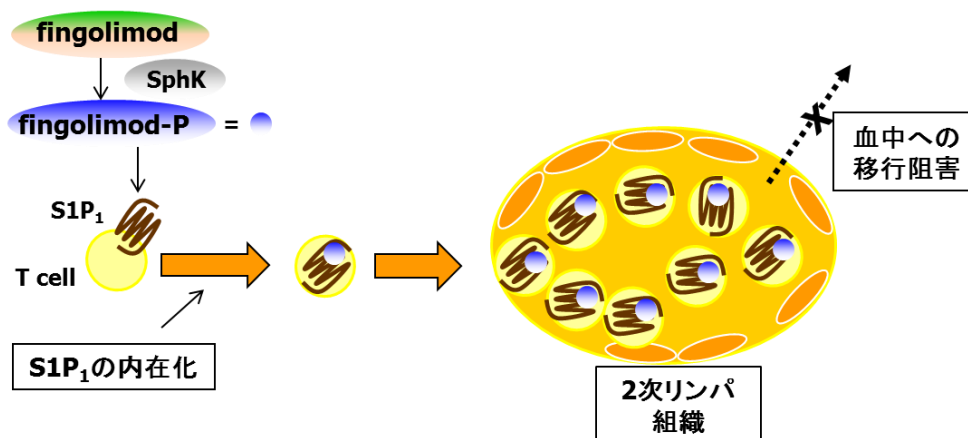


Figure 1-7. Mechanism of lymphocyte homing action.

また、リンパ球ホーミング作用には $S1P_1$ へのアゴニスト作用が重要であると同時に、 $S1P_3$ に対するアゴニスト作用は fingolimod の主な副作用である催徐脈作用（一過性の徐脈）の増悪因子であることが、ロックアウト（KO）マウスを用いた実験により示唆されている。²²⁾ これらの報告を受け、多くの製薬会社や研究機関において、 $S1P_1$ 選択的アゴニストの開発研究が活発に実施されることになった。また、fingolimod 自身も田辺三菱製薬、Novartis による約 20 年間の臨床開発を経て、2010 年に多発性硬化症治療薬として承認、上市されている。現在では、fingolimod から派生した KPR-203 **9** (Phase I, Kyorin)²³⁾ や CS-0777 **10** (Phase I, Daiichi-Sankyo)²⁴⁾ に加え、ponesimod **11** (Phase II, Actelion)²⁵⁾、BAF-312 **12** (Phase III, Novartis)²⁶⁾ のような、これまで薬効発現に必須と思われていたアミノアルコール構造を分子内に持たない化合物なども臨床開発段階に入っている (Figure 1-8)。

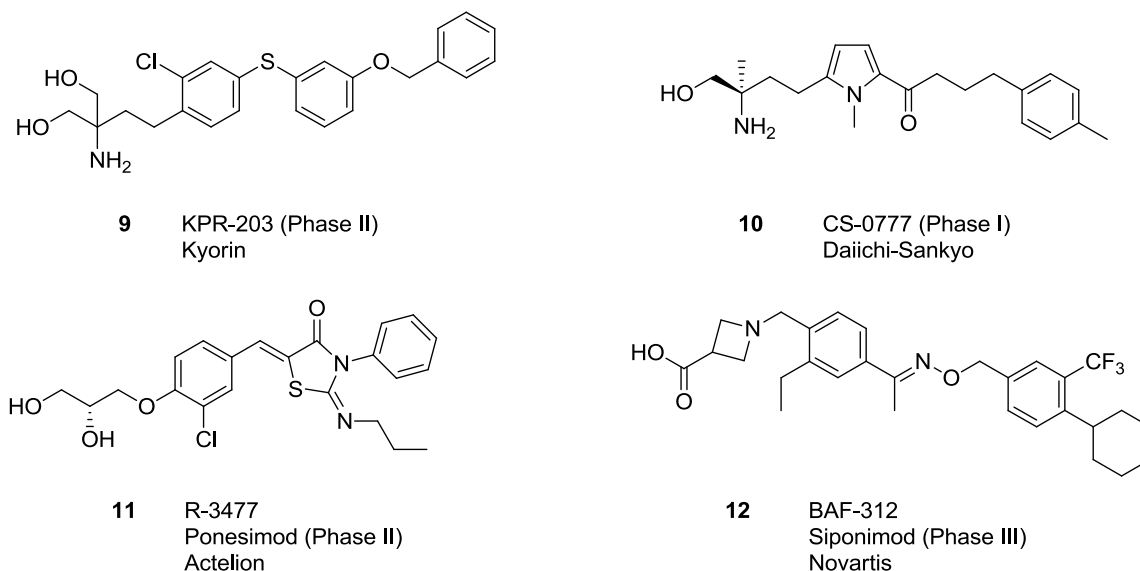


Figure 1-8. Clinical development compounds of $S1P_1$ agonists.

第 5 節 研究成果の概略

上述したように、fingolimod は非常にユニークな作用機序と、その強力な免疫抑制効果も然ることながら、その分野において最も広く使用されているタクロリムスなどのカルリニューリン阻害剤に見られる腎毒性、肝毒性回避（軽減）が期待される薬剤として、開発段階から多くの研究機関からの注目を浴びていた。このような魅力的なプロファイルを有する fingolimod であったが、催徐脈作用（一過性の徐脈）という副作用に加え、活性本体であるリン酸エステル体 **6-P** が非常に長い血中半減期を持つことが知られており、改善の余地を残す薬剤であると考えられた。そこで、

これらの点を改善し、より安全性に優れ、強力な免疫抑制作用を有する薬剤の創製を目的に、fingolimod の構造を基とした S1P₁ アゴニストの創薬研究に着手した。

Fingolimod **6** をリード化合物とした研究を開始するにあたり、まず、その立体配置が薬効発現に重要とされるアミノプロパンジオール部位を一般式 **13** で示す光学活性メチルアミノアルコール骨格へと変更した。その上で、中心のフェニル基を各種ヘテロアリアル基へと変換した一般式 **14** で示される化合物、及び、中心芳香環とアミノアルコールユニットを繋ぐリンカー部位にエーテル結合を有する一般式 **15** で示される化合物を基本テンプレートとしてデザインし、2 系統での誘導体展開を実施した (Figure 1-9)。なお、中心芳香環から伸長する疎水性側鎖については、各種検討の結果、薬効面、新規性面、合成面等において総合的に優れていたカルボニル基を有する側鎖へと変換した。

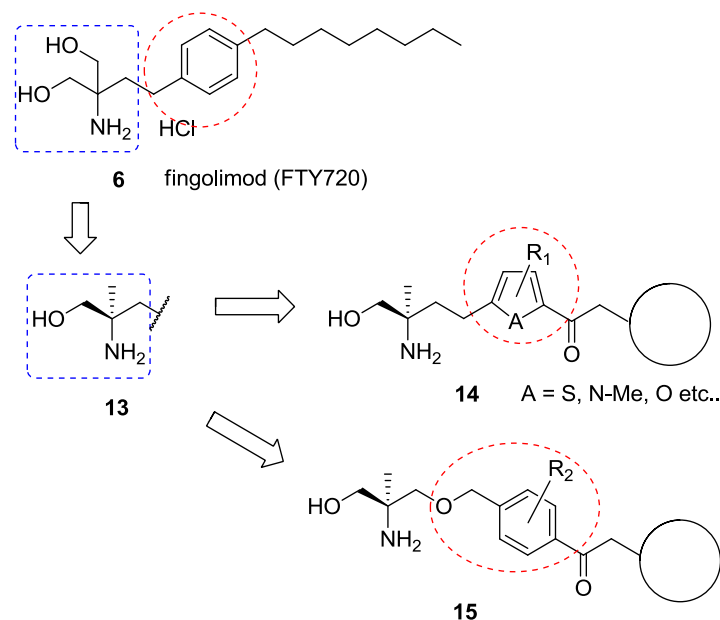


Figure 1-9. Structural modification from fingolimod **6**.

本学位論文では、この 2 系統の誘導体展開を行うにあたり、一般式 **14** で示される化合物合成に必要であった各種合成技術の開発 (第 2 章、第 3 章、第 4 章) に加え、その合成技術を活用した、一般式 **15** で示されるエーテル化合物の構造活性相関研究 (第 5 章) について述べている。以下、各章の概略を紹介する。

第 2 章では、一般式 **14** の周辺化合物合成を効率良く行うため、中間体として設定した **16** の合成において、リパーゼを用いた不斉非対称化反応を利用した構築法について述べている。²⁷⁾

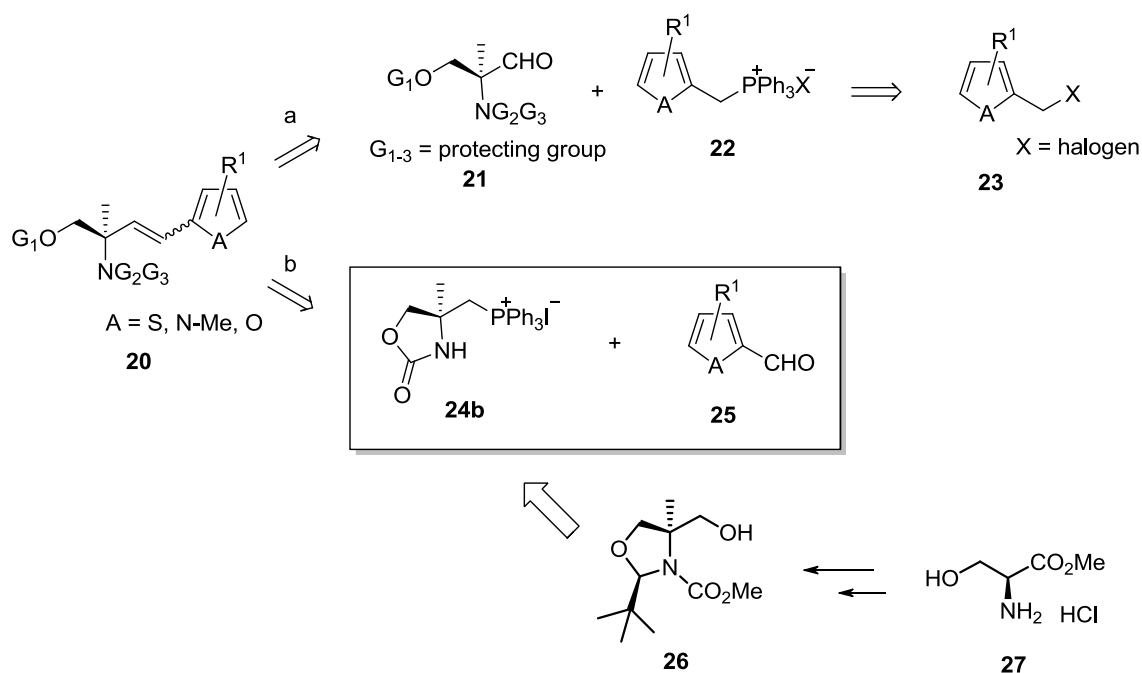


Figure 1-11. Summery in Chapter 3.

調製したホスホニウム塩 **24b** は様々な脂肪族、芳香族アルデヒドと良好に反応することが判明した。特に、本 Wittig 反応は、対応するホスホニウム塩が調製困難である電子豊富な芳香環を有するアルデヒドに対しても進行し得るものであり、従来法に対して相補的に機能する反応であった。さらに、本手法は $S1P_1$ アゴニスト研究における鍵中間体 **30** や他グループにより報告されている $S1P_1$ アゴニスト (**28**、**29**) を短段階で与えたほか、Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) アゴニスト **31** の合成においても有用であった (Figure 1-12)。

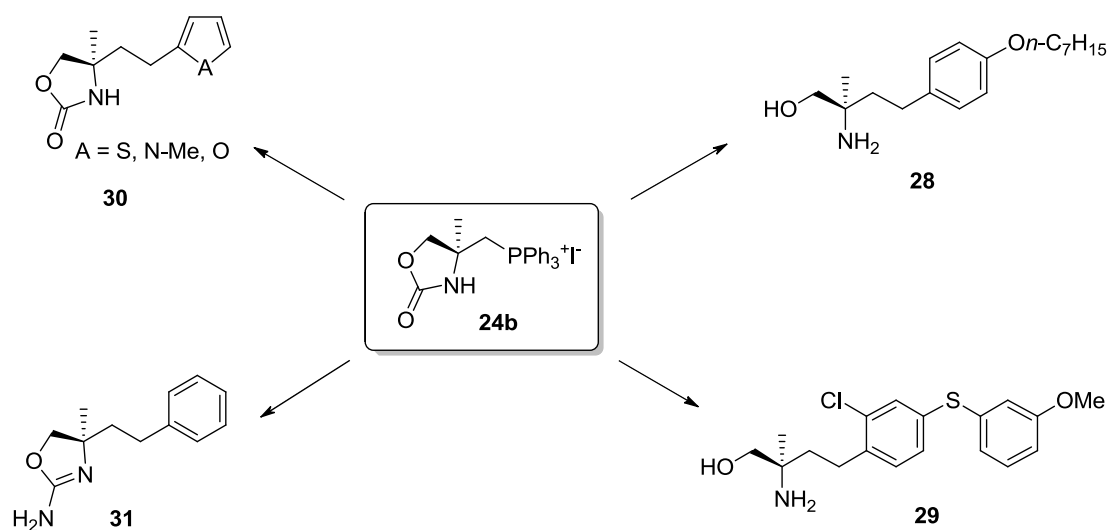


Figure 1-12. Application of phosphonium salt **24b**.

第4章では、親化合物のアミノアルコール体から活性本体であるリン酸エステル体への微生物変換を利用した効率的合成法について述べている。²⁹⁾

S1P₁ アゴニストの活性本体は、fingolimod **6** がそうであるように、親化合物 **32** の一級水酸基がリン酸エステル化された **32-P** である。そのため、S1P 受容体に対するアゴニスト活性を測定する際には、リン酸エステル体（標品）を別途合成する必要があった。しかしながら、親化合物であるアミノアルコール体からリン酸エステル体への一般的な化学合成においては、アミノ基やリン酸エステル基上の水酸基に対する保護基の着脱が必須であり、多検体のスクリーニングを実施する際には直接的で簡便な手法が望まれていた。そこで、所有する独自の微生物ライブラリー（糸状菌、細菌、放線菌）を用いて、親化合物であるアミノアルコール体の一級水酸基を直接的にリン酸エステル化する作用を持つ微生物のスクリーニングを実施した。検討に用いる反応基質には、一般式 **14** の誘導體展開により見出された、強力な免疫抑制活性を有するピロール化合物 **32** を選定した。検討の結果、強力なリン酸エステル化能を有する *Circinella muscae* を見出し、さらに、その菌体を凍結乾燥状態にすることで飛躍的に反応性を向上させることに成功した。また、本手法と質量分析計を用いた自動精製システムを組み合わせることにより、親化合物から1工程でリン酸エステル体を得る効率的なリン酸エステル誘導體合成を実現した（Figure 1-13）。

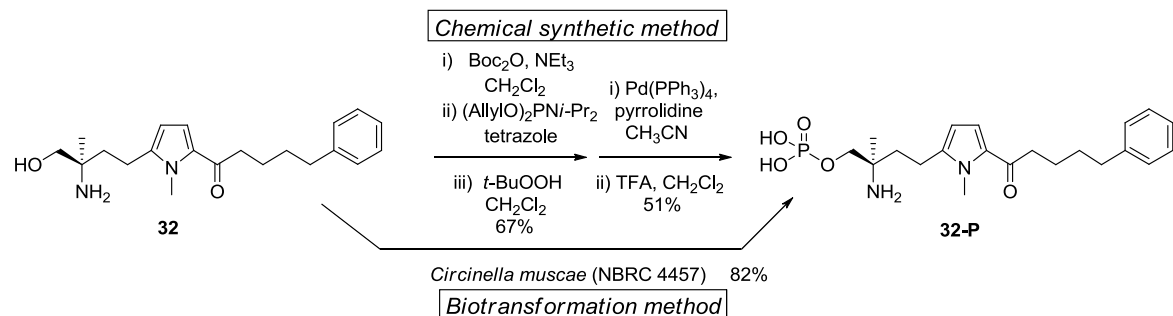


Figure 1-13. Summary in Chapter 4.

第5章では、短半減期型 S1P₁ アゴニストを志向したエーテル化合物 **33** の構造活性相関（SAR）研究について述べている。³⁰⁾

これまで述べてきたように、強力な免疫抑制作用を示す fingolimod は副作用として一過性の徐脈作用に加え、非常に長い血中半減期を持つことが判明していた。また、第2章から第4章で述べた各種合成法を活用した一般式 **14** の誘導體展開から見出された、**32** や臨床開発化合物 CS-0777 **10** なども、強力な免疫抑制薬効を持つ有望な化合物である一方で、fingolimod と同様に比較的長く体内に貯留する傾向があった。そこで、創薬の成功確率向上のため、一般式 **14** で示す化合物群とは異なるプ

ロファイルとして、適度な半減期、かつ催徐脈作用のない化合物の獲得を目指し、中心芳香環とアミノアルコールユニットを繋ぐリンカー部位にエーテル結合を持つ **33** をデザインし、その SAR 研究を実施した (Figure 1-14)。その結果、**33a** は、fingolimod **6** と比較して血中半減期が短く、さらに良好な S1P₃/S1P₁ 選択性と強力な *in vivo* 薬効を有することが判明した。また、中心ベンゼン環上の置換基導入は選択性を大きく向上させることや、*in vivo* 薬効が親化合物のリン酸エステル化効率と関連することを明らかとした。各種検討の結果、適度な血中半減期を持ち、fingolimod **6** と同等の強力な *in vivo* 薬効を示し、さらに徐脈作用に対して十分な安全域を有する化合物 (**33b**、**33e**) を見出すことに成功した。

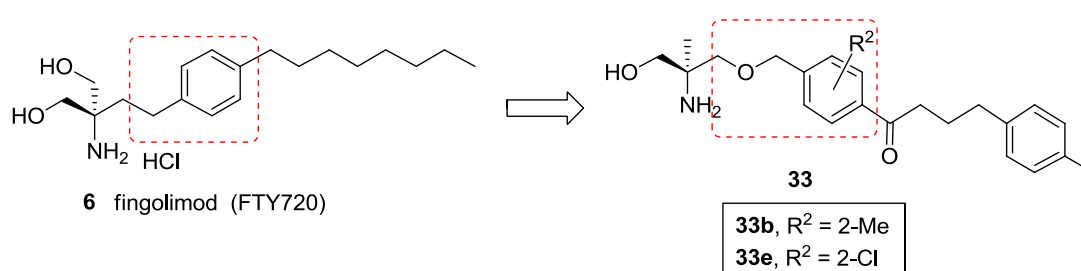


Figure 1-14. Summary in Chapter 5.

第 6 節 結語

以上、第 1 章では、新規な免疫抑制薬として期待される fingolimod と、その作用機序に関与する S1P 受容体の機能について述べた。本文中にも示したように、スフィンゴ脂質類の生体内シグナルとしての作用解は近年になり急速な発展を遂げたものであり、S1P₁ アゴニスト化合物としての fingolimod に代表されるように、S1P 関連の分野は今後も重要な創薬標的になることが予想される。本博士論文中で紹介する fingolimod をリードとした誘導体展開において、薬効面、安全性面で優れた化合物の創製は然ることながら、それら S1P₁ アゴニスト化合物の新規合成法の確立も非常に重要な意味を持つと考えられる。

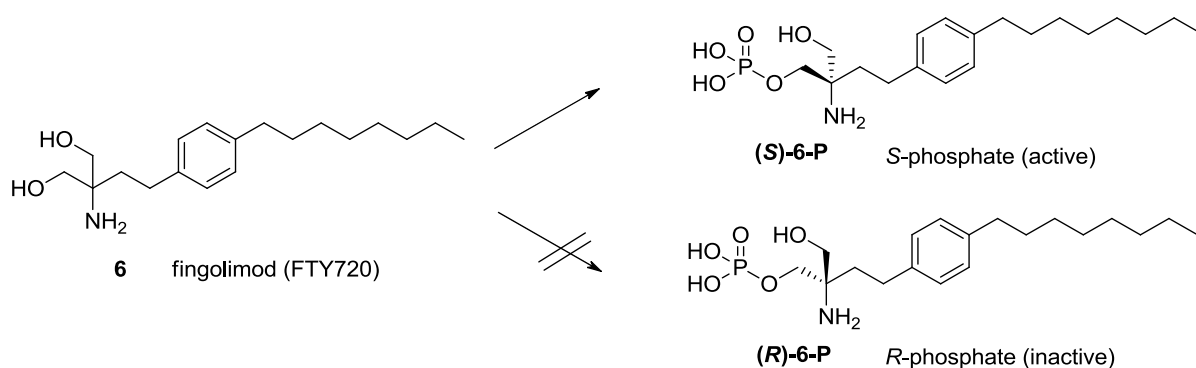
第 2 章

2-アミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオールの酵素を用いた不斉非対称化反応

第 1 節 序論

第 1 章で述べたとおり、fingolimod (FTY720) **6** はこれまでにない新しい作用機序を有する免疫抑制薬として期待される新薬であり、2-アミノ-1,3-プロパンジオール構造が重要な pharmacophore であることが判明している。Fingolimod **6** は、生体内に投与された後、血中にて二つの等価な水酸基のうち、一つがリン酸エステル化される。また、そのリン酸エステル化は高エナンチオ選択的に進行し^{20,31)}、生じた *S*-リン酸エステル体 (*S*)-**6-P** が標的である S1P₁ に作用することで薬理作用を発揮することが知られている。さらに、S1P₁ に対してアゴニスト活性を示すのは *S*-リン酸エステル体 (*S*)-**6-P** のみであり、生体内でのリン酸エステル化では生じない *R*-リン酸エステル体 (*R*)-**6-P** のアゴニスト活性は非常に低いことも明らかとされている (Table 2-1)。³²⁾ このように fingolimod の 2-アミノ-1,3-プロパンジオール構造は血中でのリン酸エステル化、および S1P 受容体への作用の両過程で厳密な不斉認識を受けていることがわかる。

Table 2-1. Phosphates of fingolimod and their binding affinity to S1P receptors.^a



Compound	EC ₅₀ (nM)				
	S1P ₁	S1P ₂	S1P ₃	S1P ₄	S1P ₅
6 (fingolimod)	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
(<i>S</i>)- 6-P	0.30	>10000	3.1	0.60	0.30
(<i>R</i>)- 6-P	218	>10000	29	80	>10000

^a Binding affinity to each S1P receptor was calculated by GTPγ-S binding assay and the details are shown in experimental section

上記結果は、アミノアルコール部位の立体化学が薬効発現に非常に重要な要素であることを表しているが、同様の結果は、他グループで実施された誘導体展開によっても得られている。³³⁾ すなわち、fingolimod **6** を基に合成された二つのエナンチオマー (**R**)-**28** と (**S**)-**28** は、臓器移植を模した *in vivo* モデルの一つである HvGR (Host versus Graft Reaction) 試験において、*R* 体 (**R**)-**28** が薬効を発現し強力な免疫抑制作用を示す一方で、逆の立体である *S* 体 (**S**)-**28** は全く活性を示さないことが報告されている (Figure 2-1)。

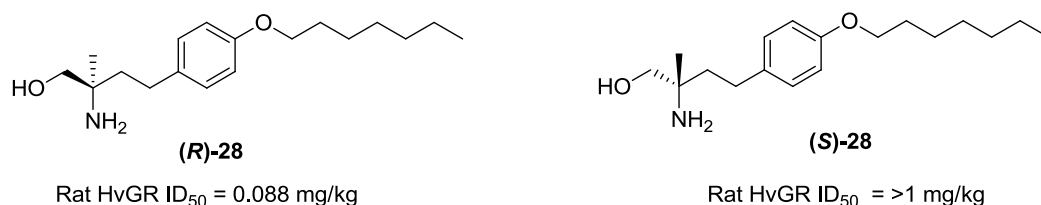


Figure 2-1. Chiral derivatives of fingolimod and their *in vivo* activities.

上記の結果から、fingolimod の有する 2-アミノ-1,3-プロパンジオール構造部位を構造変換する際には、厳密な光学活性体の作りわけが重要であることがわかる。

世界中で S1P₁ アゴニスト研究が脚光を浴びる中、私も新規な S1P₁ アゴニスト化合物を獲得すべく、fingolimod の構造を基に各種変換を行ってきた。

まず、fingolimod が持つ 2-アミノ-1,3-プロパンジオール構造 (青点線枠) については、(2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造へと変換することとした。その上で、中心のフェニル基 (赤点線枠) については各種ヘテロアリアル基へと変換した化合物をデザインした。なお、fingolimod のフェニル基は、大きな極性変化を伴わないヘテロ芳香環としてチオフェン、フラン、ピロール環へと変換した。Fingolimod の右側疎水性側鎖部位 (緑点線枠) については、様々な検討の結果、カルボニル基を有する側鎖が合成面、新規性面、活性面などにおいて総合的に優れていることが判明しており、結果として、一般式 **14** で表される一連の化合物群に強力な免疫抑制薬効が見出された。一般式 **14** で表される誘導体を合成するにあたり、疎水性側鎖部位は最終段階で導入することとし、鍵となる中間体として **16** を設定した。これに伴い、種々のヘテロ環導入には、利便性を有し、大量合成にも対応可能な(2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造 (青点線枠) の合成法の確立が必要となった (Figure 2-2)。

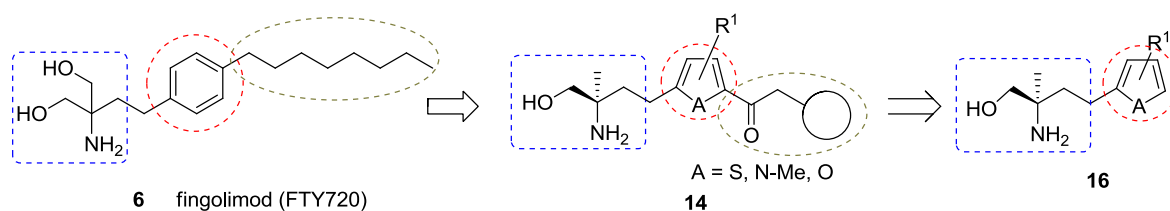


Figure 2-2. Structural modifications of fingolimod **6**.

光学活性化合物の合成法は、光学分割と不斉合成という二手法に大別することが可能であり、それぞれ円熟した化学手法として膨大なバリエーションが存在する。

光学分割法では、不斉認識部位を担持した固定相を用いてカラムクロマトグラフィーを行う方法が、HPLC装置の発展やその簡便さから一般に広く用いられている。また、分割したいラセミ混合物に安価なキラル化合物を作用させて二種類のジアステレオマーへと誘導し、その溶解度の差や極性差を利用して分割する方法なども一般的に用いられる手法である。これらの方法はラセミ体さえ合成できれば適用可能であるため、少量のラセミ体の分割や、安価なラセミ体の分割には有用かつ強力な合成手法となるが、分量の不要な光学活性体を不可避な副生物として伴うという点で本質的に無駄の多い手法とも言える。

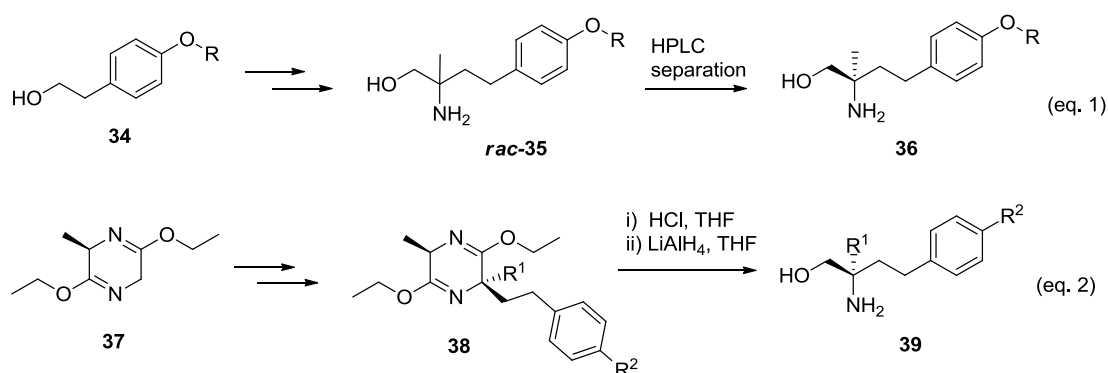
一方、不斉合成法は、最高収率が理論上 50%を超えない分割法に比べて洗練された手法とも言える。中でも、野依らによる不斉水素化反応³⁴⁾や、Sharplessらによる不斉酸化反応³⁵⁾に代表される不斉配位子と金属触媒を組み合わせた不斉反応は、いまや欠くことのできない科学技術である。³⁶⁾ そのような不斉合成法の一つである不斉非対称化反応は、プロキラルなメソ体を原料とし、同一環境下に置かれた複数の反応点のうち、一つの反応点に対し選択的に反応を進行させることでキラルな化合物へと導く反応である。また、このような反応は、金属触媒よりも微生物や酵素などの生体触媒が得意とする分野であり、多くの利点を持つことが知られている。³⁷⁾ すなわち、生体触媒を用いた不斉合成法の多くは、加熱などの処理が不要で温和な条件化での反応が可能である点や、基質中に存在する反応点以外の官能基を無保護状態のまま目的の変換反応のみを行うことが可能である点などにおいて優れており、現在も活発に研究が行われている分野である。³⁸⁾

このような優れた特徴を有する生体触媒を利用した不斉非対称化反応は、私がデザインした化合物の中間体合成においても有効であると考え、その検討を実施した。

本章では、光学活性体(2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造（青点線枠）構築法としての酵素を用いた不斉非対称化反応と、得られるアルコール体の応用例について述べる。

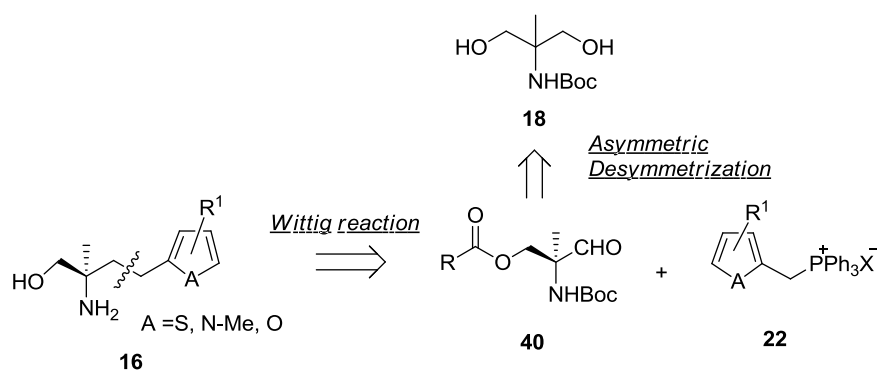
第 2 節 リパーゼを用いた不斉非対称化反応

当時、(2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造を有する化合物 (**36** など) の多くはキラル HPLC を用いたラセミ体 (*rac*-**35** など) の光学分割により合成されていた (Scheme 2-1, eq. 1)。³³⁾ しかしながら、既述したように、その手法は無駄が多く、多検体の合成には不向きなものであった。その後、キラル補助基を用いた不斉アルキル化合成法が開発されたが、その合成法においても、用いる保護基の脱保護に強力な塩基や還元剤が必要であり、官能基許容性の観点からも十分な手法とは言い難かった (Scheme 2-1, eq. 2)。³⁹⁾



Scheme 2-1. Synthetic routes of chiral analogue **36** and **39** of fingolimod **6**.

そこで、より効率的な合成法確立を目的とし、新たに(2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造を有する化合物 **16** の製法検討を行うことにした。**16** の合成法における逆合成ルートを Scheme 2-2 に示す。



Scheme 2-2. Retrosynthetic routes of key intermediate compound **16**.

鍵中間体 **16** の合成は、光学活性体(2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造を有するアルデヒド **40** とヘテロアリーールを含むホスホニウム塩 **22** との Wittig 反応によ

り構築することとした。また、光学活性ユニットを持つアルデヒド **40** は、その構造が有する対称性に注目し、安価に市販されている 2-メチル-2-アミノ-1,3-プロパンジオールの *N*-Boc 保護体 **18** を出発原料とした不斉非対称化反応と、続く酸化反応により合成可能と考えた。当時、1,3-プロパンジオールの不斉非対称化反応については、2-モノ置換体に対する酵素を用いた不斉非対称化反応の合成例は多く存在していたが⁴⁰⁾、2,2-二置換体に対する報告例はあまりなかった。⁴¹⁾ そこで、当時報告されていた中から、2-モノ置換体である 2-アミノ置換体 1,3-プロパンジオールに対する酵素を用いた不斉非対称化反応^{40i, j)} に注目し、目的とする不斉非対称化反応の検討を開始した。

初めに、基質である 2-メチル-2-アミノ-1,3-プロパンジオールの *N*-Boc 保護体 **18** に対し、溶媒としてジイソプロピルエーテル、アシル化剤としてヘキサン酸ビニルを使用し、各種リパーゼ存在下、室温で 3 時間反応させた場合のモノエステル体 (**R**)-**17a** への変換について検討した (Table 2-2)。

Table 2-2. Asymmetric reactions of **18** with Lipase (1).^a

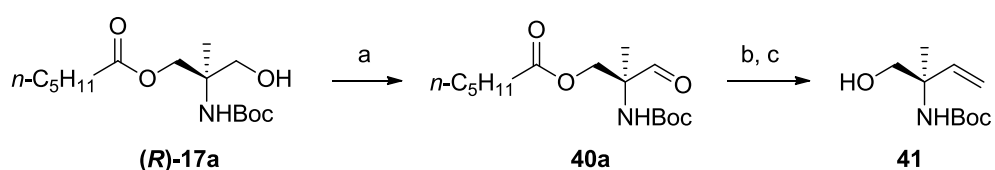
Entry	Lipase	Yield (%) ^b	%ee of (R)- 17a ^c
1	Immobilized lipase from <i>Pseudomonas</i> sp.	88	89
2	Lipase, immobilized on cellulose from <i>Pseudomonas</i> sp.	89	84
3	Lipase from hog pancreas	32	35
4	Lipase from <i>Penicillium requeforti</i>	17	58
5	Lipase AK "Amano" 20	32	20
6	Lipase, immobilized in Sol-Gel-AK on sintered glass from <i>Mucor miehei</i>	33	10
7	Lipase from <i>Mucor javanicus</i>	24	37 (S)
8	CHIRAZYME L-2, carriere-fixed C3, Iyo	80	12 (S)

^a Each reaction was performed for three hours and the details are shown in experimental section.

^b Product yields were the isolated yields.

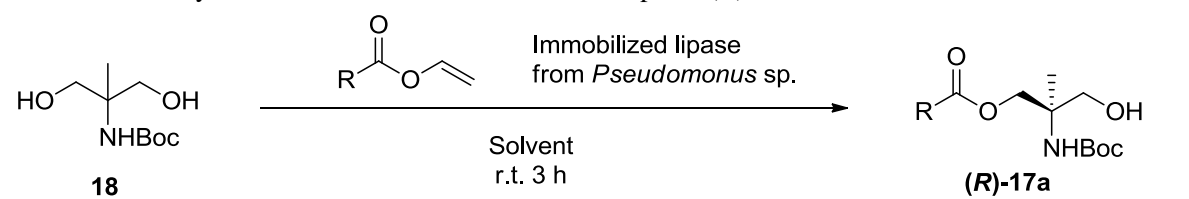
^c The enantiomeric excess values of the products were measured by chiral HPLC column.

その結果、用いるリパーゼによって収率、光学純度は大きく変化することが判明し、*Pseudomonas* 種由来の固定化リパーゼが最良の結果を与え、目的とする *R* 体 (**(R)-17a**) が 88%収率、89%ee で得られてきた (Entry 1-6)。一方、ほとんどのリパーゼが目的とする *R* 体を主生成物として与えたのに対し、*Mucor javanicus* 由来のリパーゼと CHIRAZYME を用いた場合には、今までとは逆のエナンチオマーである *S* 体を主生成物として与えることが判明した。この CHIRAZYME を用いた反応と、得られる *S* 体の応用例については、後ほど紹介する。なお、(**(R)-17a**) の絶対配置と光学純度の確認は、Scheme 2-3 に示す方法により既知化合物である **41**⁴²⁾ へ導いた後、比旋光度の比較、及び、キラル HPLC 分析により決定している。



Scheme 2-3. Reagent and conditions: (a) PCC, MS4A, CH₂Cl₂; (b) Ph₃PCH₃Br, *t*-BuOK, THF; (c) aq. NaOH, MeOH.

続いて、先の検討で最も良い結果を与えた *Pseudomonas* sp. から得られた固定化リパーゼを用い、アシル化剤と溶媒について検討を行った (Table 2-3)。

Table 2-3. Asymmetric reactions of **18** with Lipase (2).^a


Entry	R	Solvent	Yield (%) ^b	%ee of (R)- 17a ^c
1	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	-	83	77
2	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	<i>i</i> -Pr ₂ O	88	89
3	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	<i>t</i> -BuOMe	84	89
4	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	<i>n</i> -Hexane	82	86
5	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	Toluene	87	81
6	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	Et ₂ O	89	79
7	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	CH ₂ Cl ₂	95	78
8	<i>n</i> -C ₅ H ₁₁	THF	78	77
9	CH ₃	<i>i</i> -Pr ₂ O	43	62
10	<i>n</i> -C ₃ H ₇	<i>i</i> -Pr ₂ O	52	75
11	<i>n</i> -C ₇ H ₁₅	<i>i</i> -Pr ₂ O	86	82
12	<i>n</i> -C ₉ H ₁₉	<i>i</i> -Pr ₂ O	60	71
13	(CH ₃) ₃ C	<i>i</i> -Pr ₂ O	69	53

^a Each reaction was performed for three hours and the details are shown in experimental section.

^b Product yields were the isolated yields.

^c The enantiomeric excess values of the products were measured by chiral HPLC column.

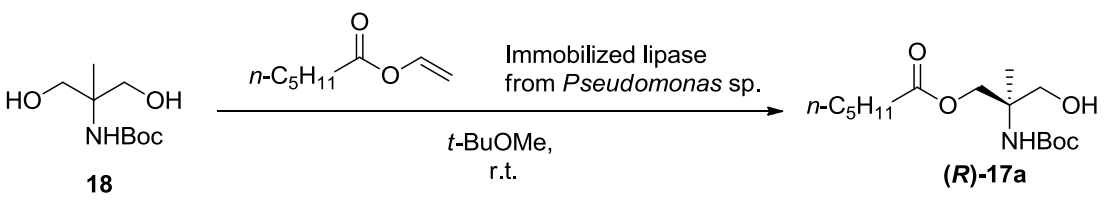
各種溶媒について検討した結果、収率、選択性に劇的な変化は見られず、初期条件の収率、選択性を共に上回る条件を見出すことはできなかった (Entry 1-8)。すなわち、溶媒としてジクロロメタンを用いた場合には、収率は向上したが、選択性が減弱する結果となり (Entry 7)、*tert*-ブチルメチルエーテルは良好な収率、選択性で目的物を与えたが、初期条件 (ジイソプロピルエーテル) の結果を上回るものではなかった (Entry 2, 3)。

続いて使用するアシル化剤の検討を行った。その結果、用いるビニルエステルのアルキル側鎖長により収率、選択性は大きく影響を受けることが判明した。すなわち、側鎖長として炭素数が 6 つであるヘキサン酸ビニルが収率、選択性、共に最良値を与え、ヘキサン酸より長い側鎖や、短い側鎖を持つビニルエステルでは収率、選択性、共に減弱する結果となった (Entry 2 vs 9-13)。

さらに、反応時間が生成物の立体選択性に与える影響について調べた。Table 2-4

には、溶媒としてジイソプロピルエーテルとほぼ同等の結果を与えた *tert*-ブチルメチルエーテルを使用した際の結果を示している。その結果、本反応は非常に早く進行していることが判明し、反応開始後 1 時間という短い時間でも、3、4 時間反応させた場合と収率、選択性共に同等の結果が得られた (Entry 1-3)。一方で、8 時間反応させた場合には、ジエステル体の増加に伴う (**R**)-**17a** の収率低下に加え、立体選択性の低下も認められ、その減少値は時間経過と共に増加していくことが判明した (Entry 4,5)。反応時間が長くなることによる立体選択性の低下については、一度生成した (**R**)-**17a** の一部が、本反応条件下においてアシル転位を起こすことが原因と考えられる。なお、一度単離した (**R**)-**17a** は比較的安定に存在し、冷凍保存条件下では、1 週間後でも、その光学純度を維持することが判明している。

Table 2-4. Asymmetric reactions of **18** with Lipase (3).

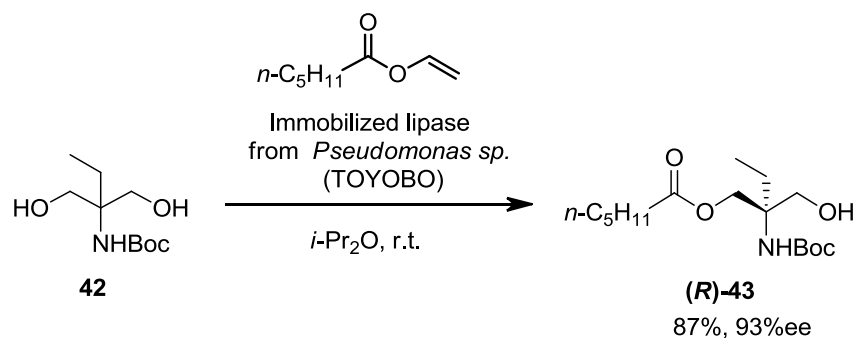


Entry	Time (h)	Yield (%) ^a	%ee of (R)- 17a ^b
1	1	87	89
2	3	84	89
3	4	85	88
4	8	82	86
5	24	70	77

^a Product yields were the isolated yields.

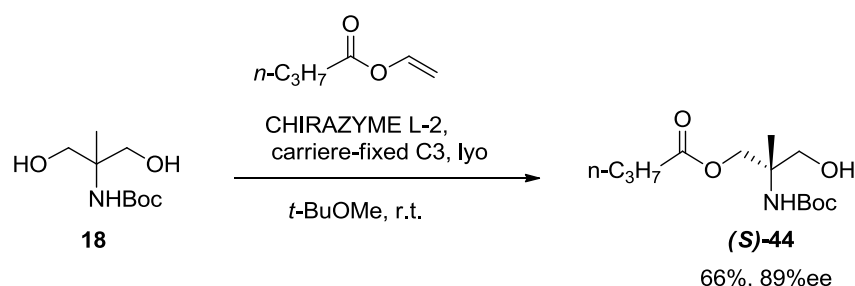
^b The enantiomeric excess values of the products were measured by chiral HPLC column.

上記検討により得られた最適条件は、2 位置換基がメチル基に限定されるものではなく、原料として 2-エチル体を用いた場合にも問題なく進行した。すなわち、2-メチル体 **18** の代わりに 2-エチル-2-アミノ-1,3-プロパンジオールの *N*-Boc 体 **42** を出発原料に用いて、上記検討により得られた最適条件に付したところ、メチル体よりも高い選択性でアシル化反応が進行し、目的物である *R* 体 (**R**)-**43** が 87% 収率、93% ee で得られた (Scheme 2-4)。



Scheme 2-4. An asymmetric reaction of compound **42** with immobilized lipase from *Pseudomonas* sp.

さらに、本酵素反応は逆の立体である *S* 体合成にも有効であった。すなわち、先の検討時、CHIRAZYME を用いた場合に得られる化合物の立体が逆転したことに注目し (Table 1, Entry 8)、収率、選択性の向上を目的として条件検討を行った結果、アシル化剤にブタン酸ビニルを用い、溶媒として *tert*-ブチルメチルエーテルを用いることで、*S* 体 (**S**)-**44** の収率、選択性をそれぞれ 66% 収率、89% ee まで向上させることに成功した (Scheme 2-5)。

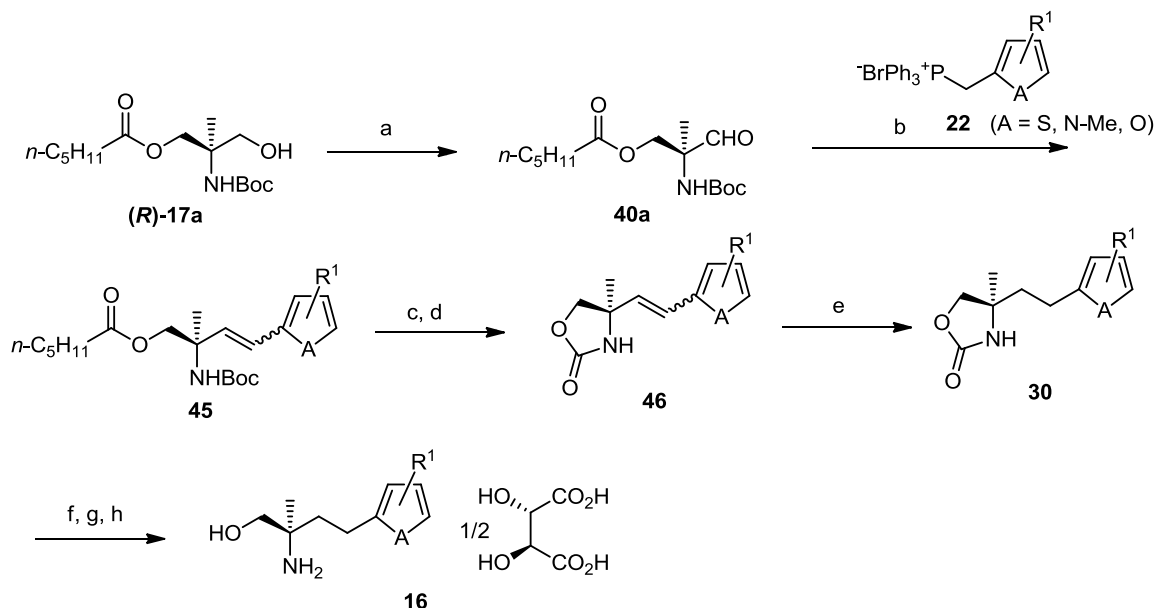


Scheme 2-5. An asymmetric reaction of compound **18** with CHIRAZYME L-2.

第 3 節 S1P₁ アゴニスト中間体合成

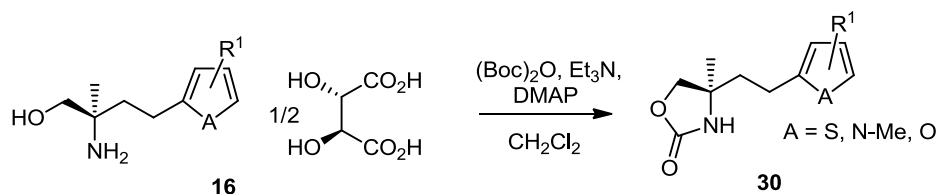
酵素反応により得られた光学活性アルコール体 (**R**)-**17a** から鍵中間体 **16** への合成は Scheme 2-6 に従い実施した。⁴³⁾ まず、*R* 体のアルコール (**R**)-**17a** を PCC 酸化し、アルデヒド体 **40a** を得た後、**40a** に対し、別途アリールメチルハライドから調製したホスホニウム塩 **22** と *tert*-BuOK を用いた Wittig 反応を行うことで **45** をジアステオ混合物として得た。**45** のエステル部位に対し、水酸化ナトリウムを用いたアルカリ加水分解を行った後、続けて *tert*-BuOK で処理することで速やかに分子内環化反応が進行し、オキサゾリジノン体 **46** が得られた。ジアステオ混合物 **46** のオレ

フィン部位はメタノール中、水素雰囲気下、Pd-Cを用いて接触還元し、還元体である **30** へと変換した。また、得られた **30** の光学純度向上は、以下に示す再結晶操作により達成した。まず、オキサゾリジノン環をアルカリ加水分解し、アミノアルコール体へと変換した後、D-(-)-酒石酸を加えて有機塩とした。得られた有機塩をエタノール、水の混合溶媒中で再結晶することにより、99%ee 以上の光学純度を有するアミノアルコール中間体 **16** を得ることに成功した。



Scheme 2-6. Reagent and Conditions: (a) PCC, MS4A, CH₂Cl₂, 95%; (b) **22**, *t*-BuOK, THF, 96-98%; (c) NaOH aq., THF, MeOH; (d) *t*-BuOK, THF, 81-100% (2steps); (e) H₂, 10% Pd-C, MeOH, 78-91%; (f) KOH aq., THF, MeOH; (g) D-(-)-tartaric acid, EtOH; (h) Recrystallization from EtOH and H₂O, 38-65% (3steps).

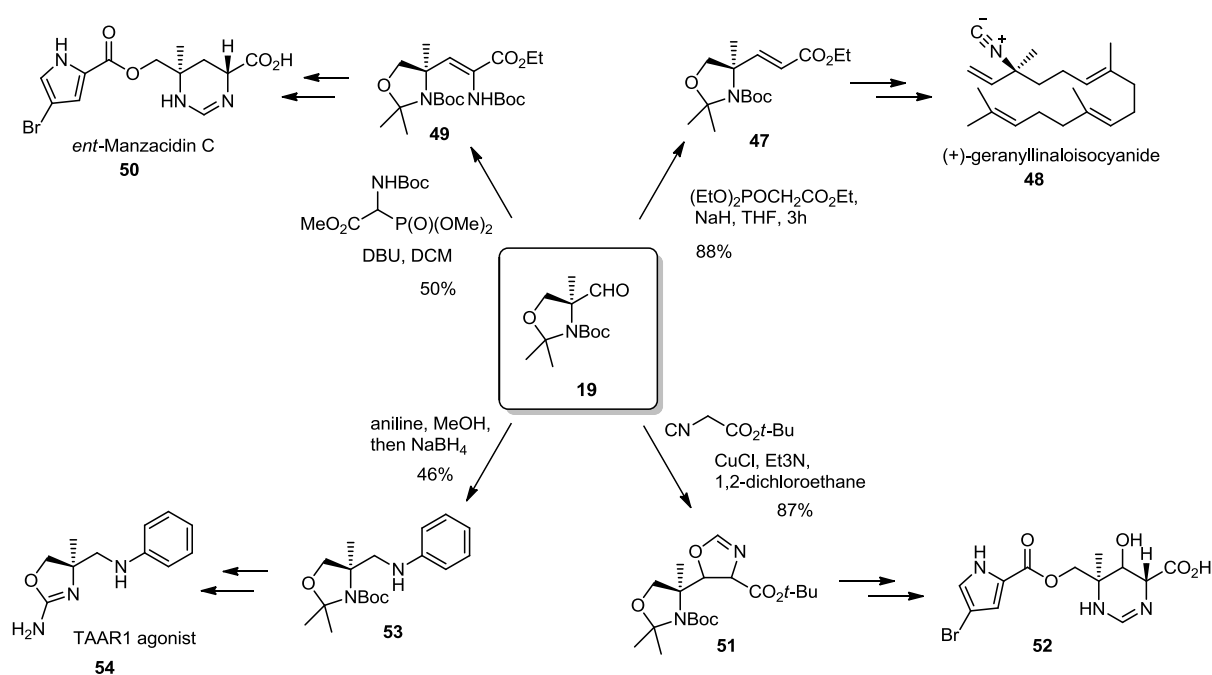
なお、**16** の光学純度は、Scheme 2-7 に従って対応するオキサゾリジノン体 **30** へと導いた後、キラル HPLC 分析を行うことにより決定している。



Scheme 2-7. Transformation of **16** to **30** for the determination of the ee value.

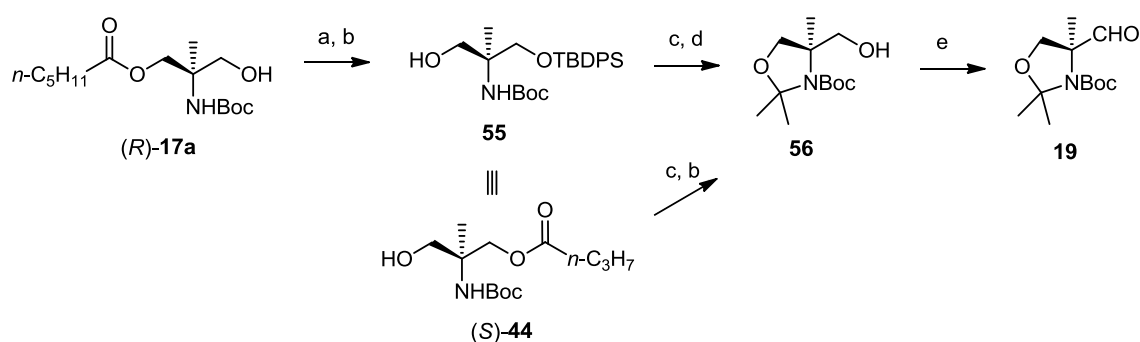
第 4 節 α -Methyl Garner's Aldehyde 合成

α -アルキル- α -アミノ酸構造は、fingolimod に代表される S1P₁ アゴニストの重要な部分骨格として存在しているだけでなく、その他の生理活性物質中にも散見される構造である。⁴⁴⁾ また、天然物として存在する化合物はもとより、創薬化学の分野においても、 α 位に導入されたアルキル基は立体制御効果と、それに伴う薬理活性向上効果を発揮するなど、ペプチド化合物のドラッグデザインにおいて重要な役割を果たしている。⁴⁵⁾ それに伴い、 α -アルキル- α -アミノ酸合成についても、現在まで多くの反応が開発されている。⁴⁴⁾ 中でも *N*-Boc-*N,O*-isopropylidene serinal (Garner's Aldehyde) タイプの中間体 **19** は有用性の高いキラルな合成素子として認識されており、Scheme 2-8 に示すように、様々な化合物の合成に利用されている。例えば、Horner-Emmons 試薬より導かれる **47** や **49** はそれぞれ (+)-geranylinaloisocyanide **48**⁴⁶⁾ や *ent*-Manzacidin C **49**⁴⁷⁾ の合成に利用されている他、銅触媒を用いたアルドール反応生成物 **51** は Manzacidine 類縁体 **52**⁴⁸⁾ 合成の前駆体として用いられている。さらに、創薬化学の分野でも、その有用性は示されている。例えば、総合失調症治療薬として報告されている Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) アゴニスト **54**⁴⁹⁾ もアルデヒド **19** の還元的アミノ化反応により生成する **53** を経由した手法により合成されている。このように重要な中間体として機能するアルデヒド **19** の調製において、今回の酵素反応により得られる光学活性化合物が利用可能と考え、その合成に着手した。



Scheme 2-8. The applications of aldehyde **19** to several bioactive compounds.

19 は Scheme 2-9 に従い合成した。まず、**(R)-17a** に対し、トリエチルアミン存在化、ジクロロメタン中、*tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) を用いて、一級水酸基をシリル基で保護した後、続いて、エステル部位をアルカリ加水分解することで **55** を得た。得られた **55** に対し、ジクロロメタン中、BF₃-Et₂O 存在下、2,2-ジメトキシプロパンを作用させ、アミノアルコール部位をアセトナイド化した後、TBAF を用いてシリル基の脱保護を行い、**56** を 4 工程 73% 収率で得た。最後に、**56** の一級水酸基を Swern 酸化することで、目的とする **19** を全 5 工程で得ることに成功した。さらに、*R* 体 **(R)-17a** に代わり、シリル保護体 **55** と同等に機能する *S* 体 **(S)-44** を出発原料とすることで、一級水酸基の保護を必要とせず、より短工程で **19** の合成が可能であった。すなわち、CHIRAZIME を用いた不斉非対称化反応により得られた *S* 体 **(S)-44** に対し、アミノアルコール部位をアセトナイド化し、エステル部位を加水分解することで、アルコール体 **19** を全 3 工程で得ることができた。



Scheme 2-9. Reagent and Conditions: (a) TBDPSCl, imidazole, CH₂Cl₂; (b) NaOH aq., THF, MeOH; (c) 2,2-dimethoxypropane, BF₃-Et₂O, CH₂Cl₂, (d) TBAF, CH₂Cl₂; (e) (COCl)₂, DMSO, CH₂Cl₂ then Et₃N.

第 5 節 結語

本章ではリパーゼを用いた不斉非対称化反応を中心に、S1P₁ アゴニストの重要な pharmacophore として知られる (2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造を有する各種ヘテロ環合成中間体の合成法について述べた。本手法は、プロキラルで安価な化合物を出発原料にできるだけでなく、同一原料から、用いる酵素を変えるだけで両立体の光学活性化合物を作り分けることが可能である点においても優れた手法であると言える。また、得られた両立体のアルコール化合物を出発原料にすることで、S1P₁ アゴニスト化合物の鍵中間体に加え、様々なペプチド合成の合成素子として利用価値が高い Garner's Aldehyde タイプ化合物も短工程での合成が可能であった。上

記結果は、本手法により得られる化合物が、様々な α,α -2 置換 α -アミノ酸構造を有する天然物合成にも応用可能であることを示唆するものである。

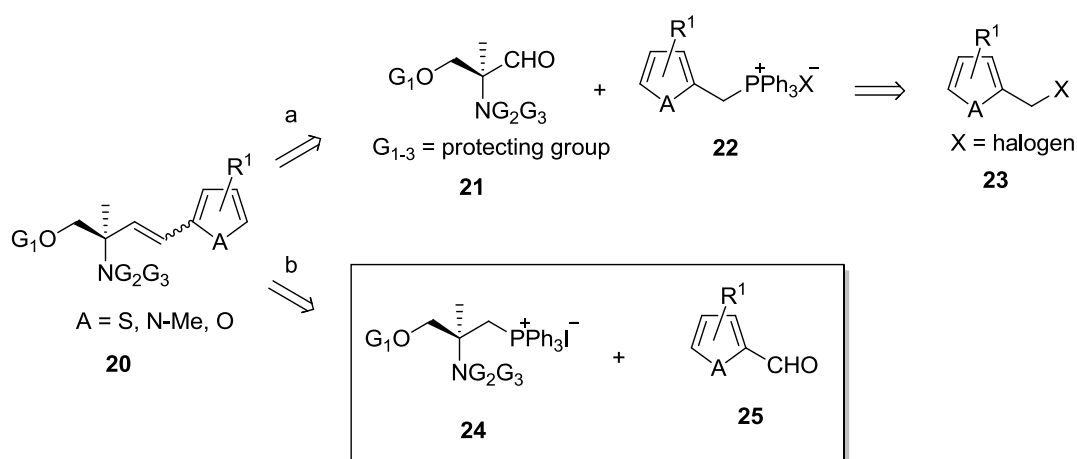
さらに、本手法により得られる光学活性アルコール体 **56** は、後の 5 章にて紹介する一般式 **33** で示す化合物群の中間体合成にも利用可能であった。また、本反応は、実験室で行われる比較的小規模の合成から、キログラムスケールの合成まで対応可能であることも確認済みである。このように、本酵素は様々な化合物の中間体として機能する汎用性が高い化合物を、効率的に合成できる優れた反応であった。

第 3 章

キラルな α,α -二置換 α -アミノアルコール構造を有するホスホニウム塩の創製

第 1 節 序論

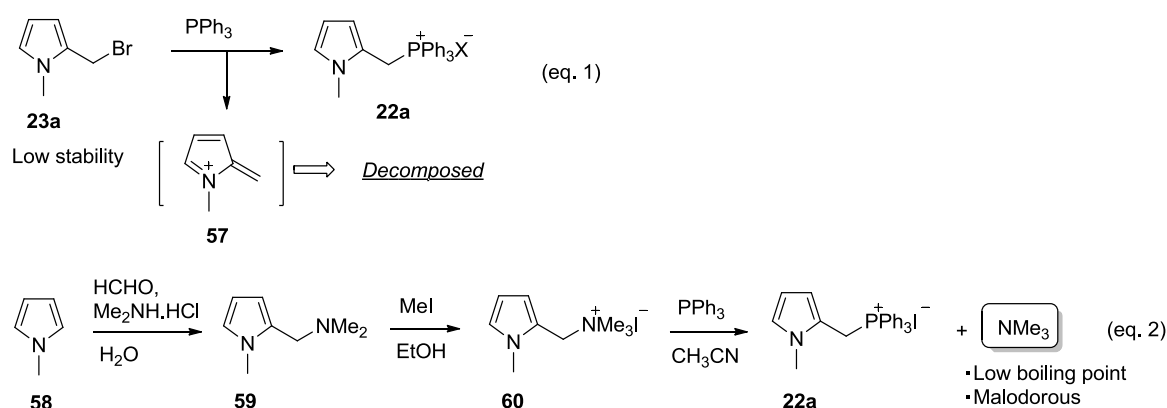
第 2 章で紹介したように、私が実施する S1P₁ アゴニストの誘導体合成にあたっては、キラルなアミノアルコール構造を有するアルデヒド **21** と、各種アリールメチルハライド **23** から調製したホスホニウム塩 **22** との Wittig 反応により中間体 **20** を合成していた (Figure 3-1, route a)。^{27,43,50)}



Scheme 3-1. Retrosynthesis of key intermediate **20** of S1P₁ modulator (a; previous route, b; new route).

本手法は中心芳香環のバリエーションを合成する上で非常に有用な手段であり、効率的な化合物合成を可能にする優れた反応であった。しかしながら、中心環として電子豊富な芳香環を導入する際には、対応するアリールメチルハライド **23** の不安定さゆえ、ホスホニウム塩 **22** の合成が困難な場合があるなどの欠点を有していた。

例えば、ピロール環を有するホスホニウム塩 **22a** を調製する場合、原料となる *N*-メチルピロールメチルハライド **23a** が不安定であり、トリフェニルホスフィンとの反応の際に並行して進行する分解反応がその調製を困難にすることが判明している (Scheme 3-2, eq. 1)。^{43b)}



Scheme 3-2. Preparation of the phosphonium salt bearing a pyrrole ring.
(eq. 1; traditional method, eq.2; Mannich method)

そのため、ホスホニウム塩 **22a** は、アリアルメチルハライド **23a** を経由しない代替法により調製していた。すなわち、*N*-メチルピロール **58** の Mannich 反応生成物 **59** に対し、ヨードメタンを反応させた四級アミン **60** をアリアルメチルハライド **23a** に代わる前駆体として用いる手法により、ホスホニウム塩 **22a** の調製が可能であった。⁵¹⁾ しかしながら、上記合成法においても、前駆体 **60** が不安定であることに加え、最終工程で低沸点悪臭物質のトリメチルアミンが発生するなどの問題を抱えていた (Scheme 3-2, eq. 2)。

そこで、それらを補う合成的手法として、極性転換の考えに基づき、アミノアルコール構造を有するホスホニウム塩 **24** とヘテロアリアルアルデヒド **25** との反応による中間体 **20** の調製法について検討することにした (Scheme 3-1, route b)。

本章では、キラルなアミノアルコール骨格を有するホスホニウム塩 **24** の調製と、そのホスホニウム塩 **24** を用いた各種アルデヒドとの Wittig 反応に加え、各種生理活性物質合成への応用について述べる。

第 2 節 アミノアルコールユニットを有するホスホニウム塩と α, α -二置換アミノ酸構造を有する生理活性物質

アミノアルコールユニットを有するホスホニウム塩については、当時、Itaya⁵²⁾ や Sibi⁵³⁾ らのグループにより **61** や **62** などが報告されており、それらホスホニウム塩と各種アルデヒドとの反応生成物は、非天然の α -置換アミノ酸合成の前駆体として利用されていた (Figure 3-1)。

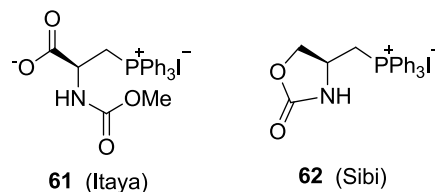
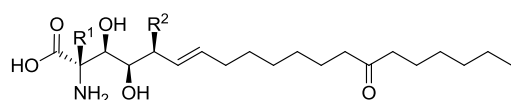
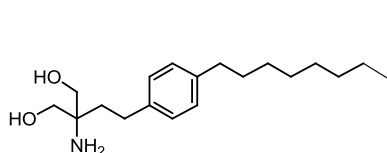


Figure 3-1. Structures of Wittig reagents bearing the tertiary carbon center at α -potiosin of amino acid unit.

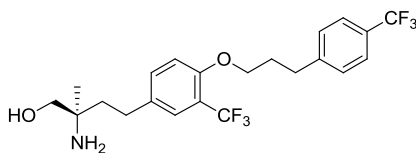
α -置換アミノ酸と同様、 α, α -二置換アミノ酸構造は数多くの生理活性物質中に見られる部分構造であり、Figure 3-2 に示すように、天然物の myriosin **4**⁵⁴⁾ や sphingofungin E **63**、sphingofungin F **64**⁵⁵⁾ などの部分構造に見られるだけでなく、創薬化学の分野においても、多くの化合物中に重要な部分骨格として存在している。例えば、先に紹介した fingolimod **6**^{20,56)} に加え、その他の S1P₁ アゴニスト化合物^{24,57,58)} の多くは α, α -二置換アミノ酸構造を有するものである。さらに、Roche らのグループにより総合失調症治療薬として報告されている Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) アゴニスト **31**⁴⁹⁾ も、 α, α -二置換アミノ酸構造から誘導される 4,5-dihydro-1,3-oxazol-2-ylamine を部分構造に持つことが知られている。以上のような背景から、今回デザインした光学活性四級炭素を持つホスホニウム塩 **24** の調製と、そのホスホニウム塩 **24** を用いたアルデヒドとの Wittig 反応の確立は、私が実施する S1P₁ アゴニスト化合物合成に応用できるだけでなく、様々な生理活性化合物に対する新規合成法になりえると考えられた。



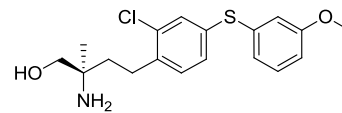
- 4; R¹ = CH₂OH, R² = H (myriocin)
 63; R¹ = CH₂OH, R² = OH (sphingofungin E)
 64; Me, R² = OH (sphingofungin F)



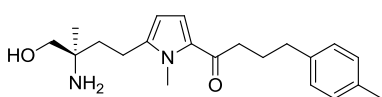
6; S1P₁ agonist
(Novartis & Mitsubishi Tanabe; fingolimod)



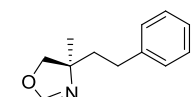
65; S1P₁ agonist
(Mitsubishi Tanabe)



29; S1P₁ agonist
(Kyorin)



10; S1P₁ agonist
(Daiichi Sankyo; CS-0777)

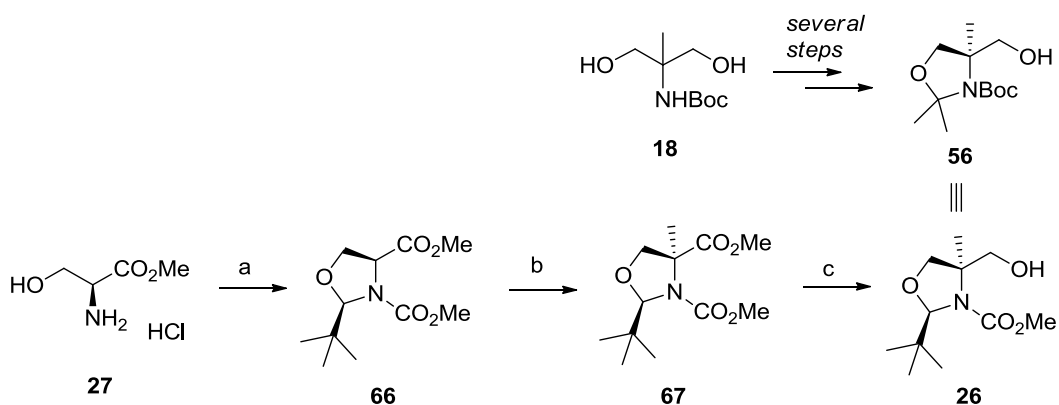


31; TAAR1 agonist
(Roche)

Figure 3-2. Biological active compounds, possessing the α,α -disubstituted α -amino alcohol unit.

第 3 節 ホスホニウム塩合成

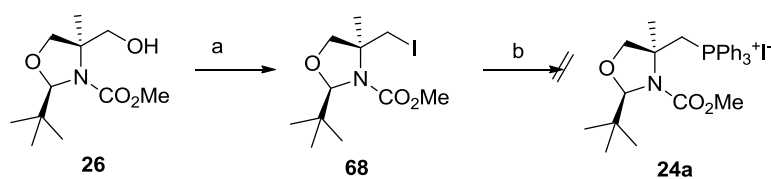
ホスホニウム塩 **24** は対応するアルコールから、ハロゲン化を経たホスホニウム塩化により合成可能と考えた。そこで、ホスホニウム塩の前駆体となる光学活性四級炭素を有するアルコール体の合成に着手することとした。当初、光学活性アミノアルコール骨格の構築は、第 2 章にて述べたリパーゼを用いた不斉非対称化法²⁷⁾を採用しており、その手法を用いてアルコール体 **56** の調製を行っていた。その後、私の所属する研究グループは、S1P₁ アゴニスト創薬研究の中で各種製法検討を実施し、光学活性アミノアルコール中間体の改良合成法を見出すことに成功した。⁵⁰⁾ その反応は、アルコール体 **56** と等価である **26** の合成法として、L-serine 塩酸塩 **27** を出発原料とする反応であり、光学純度向上のための再結晶操作を必要とせず、安価で入手しやすい原料を用いることが出来る点で優れていた。そこで、光学活性ユニットの構築法には後者の合成法を採用することとし、Scheme 3-3 に示す手法に従いアルコール体 **26** を合成した。



Scheme 3-3. Reagents and conditions: (a) *t*-BuCHO, Et₃N, toluene, then ClCO₂Me, Et₃N, toluene; (b) MeI, LiHMDS, DMPU, THF, 82% (2steps); (c) LiBH₄, THF, 98%.

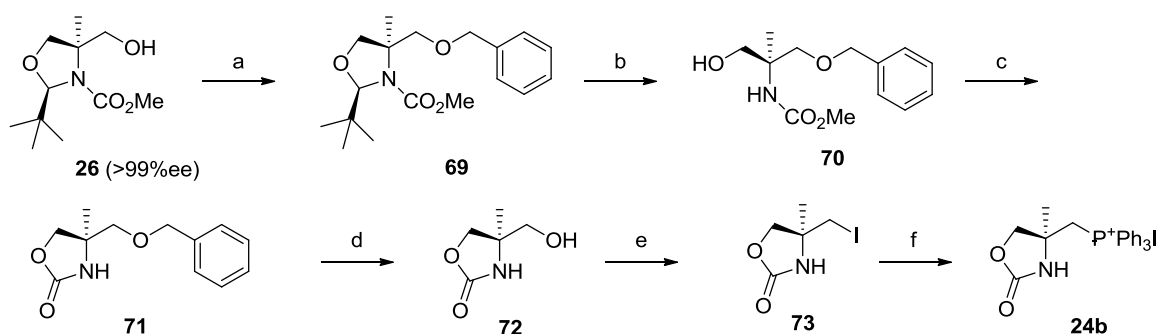
はじめに、安価に市販されている L-serine 塩酸塩 **27** を出発原料として用い、トリエチルアミン存在下、ピバルアルデヒドを用いてアミノアルコール部位のアセタール環化を行った。その後、ワンポットにてアミノ基のメチルカルバメート保護を行い、既報化合物である **66**⁵⁹⁾ を得た。得られた **66** に対し、THF 溶媒中、リチウムヘキサジシラジド (LiHMDS) と *N,N'*-ジメチルプロピレン尿素 (DMPU) 存在下、ヨウ化メチルを作用させることで、アセトナイド上に存在する *tert*-ブチル基とは逆方向から選択的にメチル化が進行し、目的の立体を有する光学活性体 **67** を得ることに成功した。最後に、水素化トリエチルホウ素リチウム (LiBH₄) を用いて四級炭素上のメチルエステル基の還元を行い、光学活性アルコール体 **26** を全 3 工程、80% 収率で合成した。なお、**26** の絶対配置と光学純度の確認は、後の Scheme 3-5 に示す方法により、既知化合物である **71**⁶⁰⁾ へ導いた後、比旋光度の比較、及び、キラル HPLC 分析により決定している。⁶¹⁾

次に、得られたアルコール体 **26** を用いて、ホスホニウム塩 **24** の合成検討を行った。各種検討を行ったが、**26** の一級水酸基をホスホニウム塩へと変換することは不可能であった。すなわち、**26** の一級水酸基をヨウ素化する反応は低収率ながら進行したものの (**68**)、続くトリフェニルホスフィンを用いたホスホニウム塩 **24a** への変換が全く進行しないことが判明した。



Scheme 3-4. Reagents and conditions: (a) PPh_3 , I_2 , imidazole, toluene; (b) PPh_3 , DMF.

トリフェニルホスフィンとヨウ素体 **68** との反応性の低さは、アミノアルコールユニット上の嵩高い置換基（保護基）による立体障害が原因であると考えられた。そこで、アミノアルコール上の置換基をより小さな置換基へと変換することとした。その際、当時 Sibi らによって報告されていたホスホニウム塩 **62**⁵³⁾ を参考にし、アミノアルコール部位をオキサゾリジノン骨格へと変換することとした。ホスホニウム塩 **24b** は Scheme 3-5 に従い合成した。



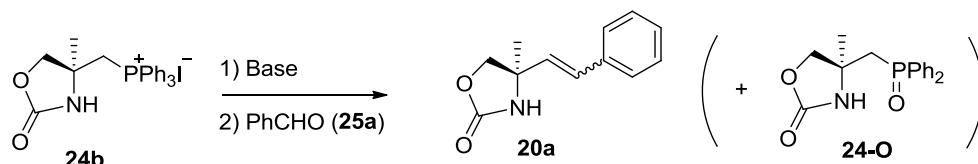
Scheme 3-5. Reagents and conditions: (a) PhCH_2Br , NaH , DMF, 88%; (b) *p*-TsOH monohydrate MeOH; (c) *t*-BuOK, THF, 95% (2steps); (d) H_2 , Pd-C, K_2CO_3 , EtOH (91%); (e) i) *p*-TsCl, pyridine, ii) NaI, acetone, 78% (2steps); (f) PPh_3 , DMF, 57%.

26 に対し、DMF 中 NaH を用いてベンジルブロミドと反応させることにより、一級水酸基のベンジル保護体 **69** を得た後、酸性条件下で *tert*-ブチルメチリデンを脱保護し **70** へと導いた。次いで、THF 中 *tert*-BuOK を作用し、オキサゾリジノン環化体 **71** を得た。得られた **71** に対し、水素雰囲気下、Pd-C を用いた接触還元反応にてベンジル基の脱保護を行い、アミノアルコール上の保護基をオキサゾリジノン骨格へと変換したアルコール体 **72** を得た。**72** は、トシル化を経由したヨウ素化反応を行い、ホスホニウム塩の前駆体であるヨウ素体 **73** へと変換した。**73** は予想通り、ヨウ素体 **68** より高い反応性を持ち、DMF 中、トリフェニルホスフィンと反応させることで目的のホスホニウム塩 **24b** を粉状結晶として得ることに成功した。

第 4 節 Wittig 反応条件検討

得られたホスホニウム塩 **24b** の Wittig 反応について、基質にベンズアルデヒド **25a** を用いた各種条件検討（塩基の種類と等量、イリドの調製温度）を実施した。その結果を Table 3-1 に示す。

Table 3-1. Wittig reactions with phosphonium salt **24b** and benzaldehyde **25a**.



Entry	Conditions	Phosphonium salt 24b (eq.)	Base (eq.)	Yield (%)	<i>E/Z</i> ^a	ee(%) ^b
1	<i>n</i> -BuLi, -78°C, 0.5 h, then r.t., 2 h	1.2	2.3	46	>99/1	N.T. ^c
2	<i>n</i> -BuLi, -78°C, 0.5 h, then r.t., 2 h	1.2	1.2	trace	N.T.	N.T.
3	<i>n</i> -BuLi, -78°C, 0.5 h, then r.t., 2 h	1.5	2.9	83	>99/1	N.T.
4	<i>n</i> -BuLi, -78°C, 0.5 h, then r.t., 2 h	2.0 ^e	3.9	99	>99/1	98.6
5	<i>n</i> -BuLi, 0°C, 0.5 h, then r.t., 2 h	2.0	3.9	N.R. ^d	--	N.T.
6	LiHMDS, -78°C, 0.5 h, then r.t., 2 h	2.0	3.9	80	>99/1	N.T.
7	NaHMDS, -78°C, 0.5 h, then r.t., 2 h	2.0	3.9	76	>99/1	N.T.

^a Established by ¹H NMR.

^b Estimated by chiral HPLC compared with the corresponding racemic compound.

^c N.T. = not tested.

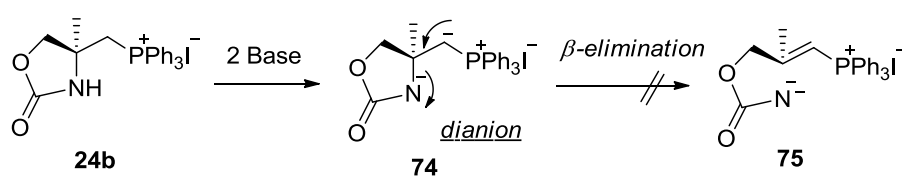
^d Benzaldehyde was 90% recovered. (N.R. = no reaction)

^e Redundant phosphonium salt **24b** was recovered as phosphine oxide **24-O** in 99% yield (based on the theoretical amount of non-reacted phosphonium salt **24b** after a regular work-up manipulation).

2.3 当量の *n*-BuLi と 1.2 当量のホスホニウム塩 **24b** を -78°C で 30 分間攪拌することにより調製したイリドに対し、-78°C で 1.0 当量のベンズアルデヒドを加えた後、室温まで昇温し、2 時間反応させたところ 46% の収率で目的のオレフィン体 **20a** が得られた。さらに、その立体は *E* 体に制御されていることが判明した (Entry 1)。なお、得られたオレフィン体の *E/Z* 比は ¹H NMR 測定により決定している。

また、その後の条件検討の結果、Wittig 反応を進行させるためには、ホスホニウム塩に対して 2 当量の塩基が必須であり (Entry 2)、さらに、反応収率は用いるホスホニウム塩を増加させることで向上し、2 当量のホスホニウム塩を用いた場合に 99% まで向上することが判明した (Entry 3, 4)。なお、本反応条件下において光学純度が損なわれていないことは、反応生成物 **20a** をキラルカラム分析することにより確認している。また、本 Wittig 反応に使用した余剰のホスホニウム塩 **24b** はそのままの状態での回収は出来ず、代わりにホスフィンオキシド **24-O** がほぼ定量的に回収された。この回収されたホスフィンオキシド **24-O** はベンズアルデヒド **25a** とは反応せず、残念ながら再利用は不可能であった。⁶²⁾

本反応系において窒素原子のベータ脱離体等の副生成物が生成することなく目的の反応が進行する理由については、-78°C の極低温下では、オキサゾリン環の窒素原子上の脱プロトン化により生じたアニオン (**74**) が窒素原子のベータ脱離 (**75**) を妨げるためと考えられる (Scheme 3-6)。このように、イリド調製時の温度は -78°C であることが必須であり、0°C まで昇温した場合にはオレフィン体が全く得られず、原料のベンズアルデヒド **25a** がほぼ定量的に回収されるという結果が得られている (Entry 5)。

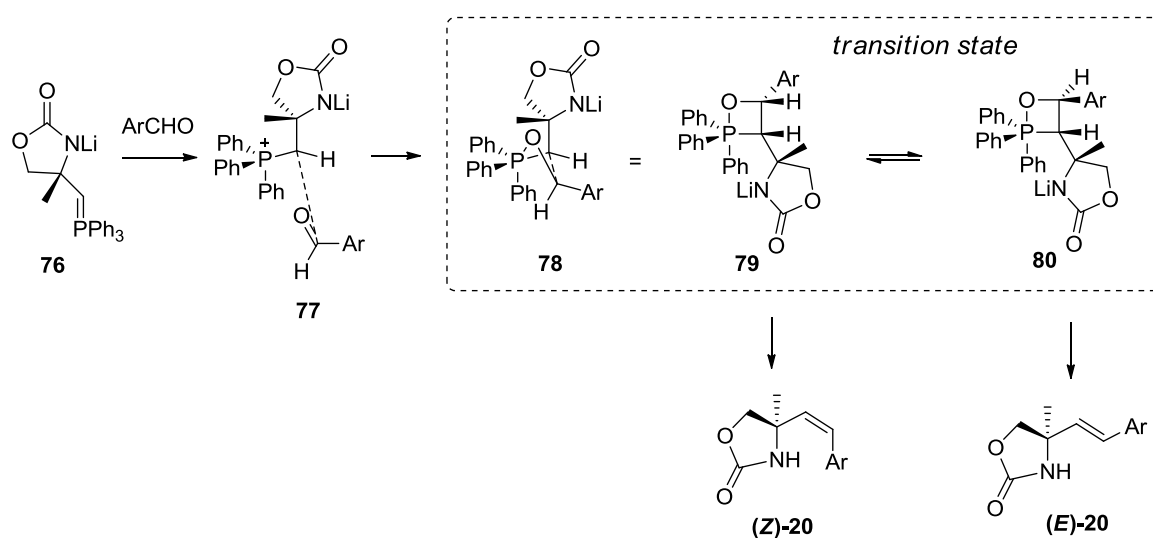


Scheme 3-6. The inhibition of β -elimination from phosphonium salt **24b**

続いて、イリド調製時に用いる塩基について検討を行った。その結果、イリド調製時の塩基は反応にあまり影響を与えず、ヘキサメチルジシラザンリチウム (LiHMDS) やヘキサメチルジシラザンナトリウム (NaHMDS) を用いた場合においても、若干の収率低下は見られるものの、反応は問題なく進行した。その際、生成物の立体は、両反応とも *E* 体のみであることが判明した (Entry 6, 7)。

一般に、Wittig 反応の *E/Z* 選択性については、反応系からリチウムイオンを除くと *E* 選択性が減少⁶³⁾ することが知られている。事実、Sibi らによる報告の中でも、

イリド調製にリチウムを含む塩基を使用した場合に >99/1 であった *E/Z* 選択性が、リチウムイオン非存在下では 3.2/1 まで減少するとされている。⁵³⁾ 一方、今回私が実施した反応系では、リチウムイオンが存在しない条件として、NaHMDS を塩基として用いた場合にも *E* 選択性は保持され、99%以上の鏡像体過剰率で *E* 体が得られてきた。このように、リチウムイオン非存在下でも *E/Z* 選択性が保持された理由については、現在以下のように考えている。まず、ホスホニウム塩より調製されたイリド体 **76** がアルデヒドに付加した中間体（遷移状態）が生成する。生成した中間体は、四級炭素を含むアミノアルコール部位の立体的な嵩高さの影響を受けることにより、*cis* 体 **79** がより不安定となり、*trans* 体 **80** から反応が進行する。その結果、*E* 体(**E**)-**20** が主生成物として得られるものと考えられる (Scheme 3-7)。

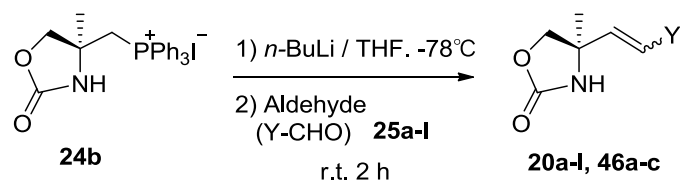


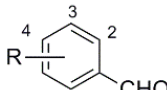
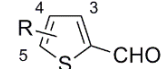
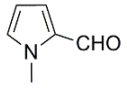
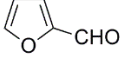
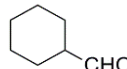
Scheme 3-7. The mechanism of the Wittig reaction with phosphonium ylide **76**.

第 5 節 基質一般性検討

次に、本 Wittig 反応の基質一般性を調べるため、上記検討により得られた最適条件 (Table 3-1, Entry 4) を用いて、各種芳香族、脂肪族アルデヒドとの反応を実施した。その結果を Table 3-2 に示す。

Table 3-2. The reactions of aromatic and aliphatic aldehydes with Wittig reagent **24b**.



Entry	Aldehyde (Y-CHO, 25)	Product (20 or 46)	Yield ^a (%)	<i>E/Z</i> ^b	
1	R = H	25a	20a	99	>99/1
2	 2,4-Me ₂	25b	20b	72	>99/1
3	2-CO ₂ Me	25c	20c	75	>99/1
4	2,4,6-(OMe) ₃	25d	20d	89	>99/1
5	4-NMe ₂	25e	20e	63	>99/1
6	R = H	25f	46a	75	>99/1
7	 3-Me	25g	20g	99	>99/1
8	3-Br	25h	20h	66	>99/1
9		25i	46b	83	>99/1
10		25j	46c	82	>99/1
11	<i>n</i> -C ₆ H ₁₃ CHO	25k	20k	62	71/29
12		25l	20l	62	88/12

^a Isolated yield.

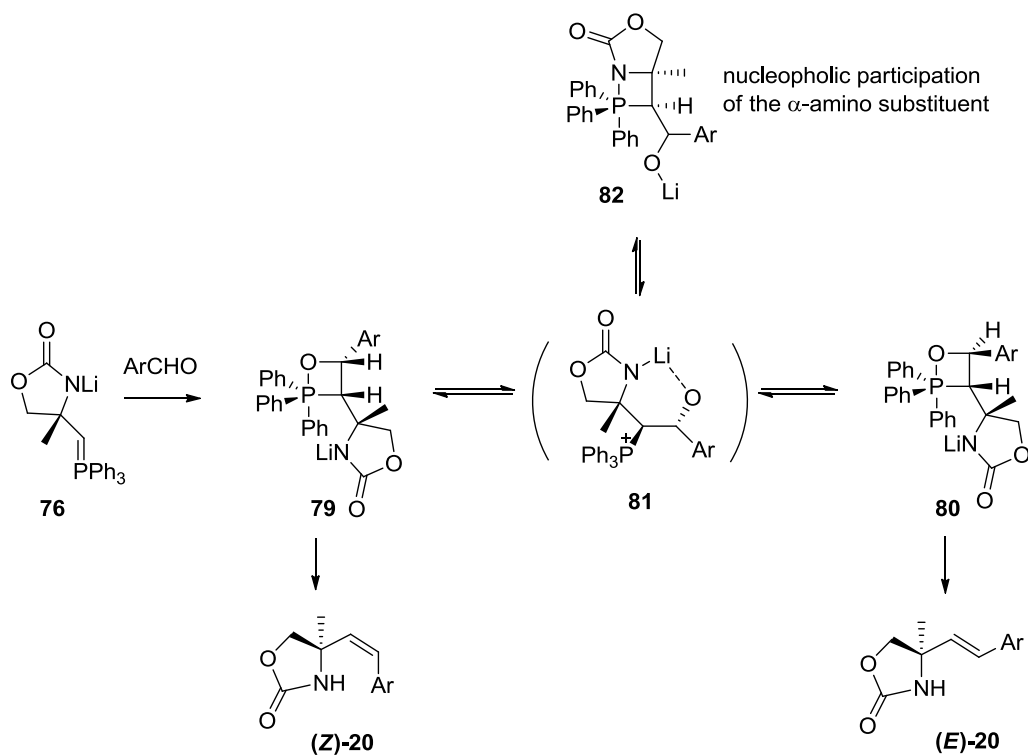
^b Established by ¹H NMR.

Table 3-2 に示すように、ホスホニウム塩 **24b** は各種芳香族アルデヒドと高い立体選択性を保ちつつ、高収率でオレフィン体を与えることが判明した (Entry 1-10)。また、ホスホニウム塩 **24b** は、それ自身が反応点近くに嵩高い四級炭素を有するにも関わらず、非常に高い反応性を有していた。すなわち、オルト位に置換基を持ち、立体障害が大きく反応性が低いと思われるアルデヒドとの反応も良好に進行し、例えば、2,4-Me₂ や 2-CO₂Me などの置換基を有するベンズアルデヒドに対しても、それぞれ 72%、75%の収率でオレフィン体を与えた (Entry 2, 3)。さらに、2,4,6-(OMe)₃ や 4-NMe₂ などの置換基を持つ電子豊富なベンズアルデヒドとの反応も問題なく進行した (Entry 4, 5)。本章、第 1 節で述べたように、一般に、オルト位やパラ位に

アルコキシ基やアルキルアミノ基などの電子供与性基を有するベンジルハライドは、その不安定さ故、対応するホスホニウム塩の調製が困難である場合が多い。^{43b)} それゆえ、今回私が確立した Wittig 反応は、電子豊富な芳香環を有する α -置換アラニノール合成において、第 2 章で紹介した従来の Wittig 反応合成法に対して相補的な手法と言えるものであった。

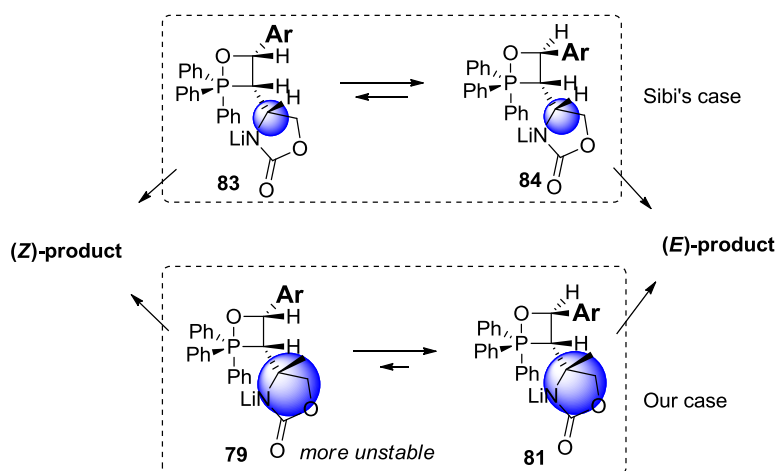
反応相手としてのアルデヒドは、ベンズアルデヒドに限定されるものではなく、チオフエンやフラン、ピロールなどのヘテロ芳香環アルデヒドとの反応も良好な収率で進行した (Entry 6, 9, 10)。また、先のベンズアルデヒドの場合と同様に、立体障害により反応性低下が予想される 3-Me や 3-Br などの置換基を有するアルデヒドにも、本反応は適用可能であった (Entry 7, 8)。なお、3-Me 体が無置換体と比較して収率が向上した理由については、現在のところ定かではないが、アルデヒド自体の安定性が異なり、3-Me 体がより安定であることが一因であると考えている。また、生成物の立体は、芳香環の種類に因らず、全て *E* 体に制御されていた (Entry 1-10)。このように高い *E* 体選択性を示した理由については、現在、次のように考えている。

本反応系の遷移状態においては、Scheme 3-8 に示したように、2 当量の塩基によりオキサゾリジノン骨格の窒素原子上がりチオ化された 2 種類のオキサホスフェタン (79, 80) と、リチウムがアルデヒド側の酸素原子と配位したベタイン中間体 81 が存在すると考えられる。このベタイン中間体 81 からは、新たな中間体として窒素-リン結合を有する 82 が生成する。このように、本反応系の遷移状態において存在する中間体の数が増加し、通常よりも中間体としての安定性が増加する結果、熱力学的支配による生成物である *E* 体 (*E*)-20 が多く生成すると考えられる。



Scheme 3-8. The role of intermediate compound **82** in our Wittig reaction.

また、以前報告されている Sibi らの研究結果と比較しても、今回行った Wittig 反応の *E* 選択性は優れていたが、その原因は用いたホスホニウム塩の立体的な嵩高さにあると考えている。Scheme 3-9 には Sibi らの反応系と今回の反応系における遷移状態を示している。今回の反応系では、オキサゾリジノン骨格部位が四級炭素になることにより、立体的な嵩高さが Sibi らの場合と比較して大きくなっている。その結果、平衡状態にある *cis* 体 **79** が **83** より不安定となり、*trans* 体 **84** に比べて **81** を経由して進行する割合が多くなったと考えられる。

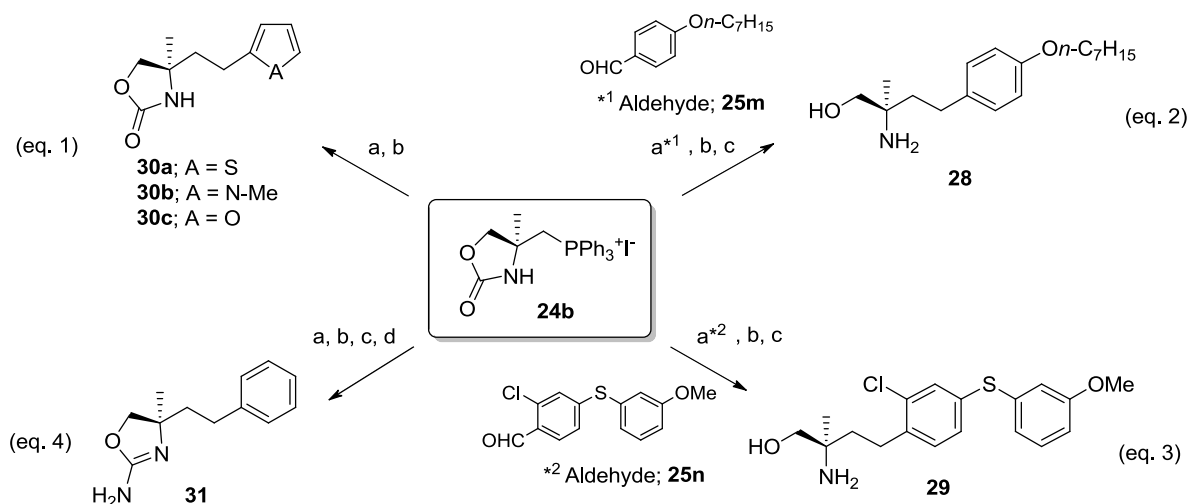


Scheme 3-9. Transition states of our and Sibi's Wittig reaction.

一方、ホスホニウム塩 **24b** と脂肪族アルデヒドの反応では、芳香族アルデヒドに比べ若干の収率低下が見られた (Entry 11, 12)。この収率低下は、反応系に存在する塩基によりアルデヒドの一部がエノラート化してしまったことが原因と考えている。また、生成物の *E* 選択性も若干低下する結果となったが、これは本 Wittig 反応において速度論的支配の割合が増加し、*cis* 体の生成物が増加したためだと考えられる。なお、同様の選択性低下は、Sibi らによる実験結果の中にも見られている。⁵³⁾

第 6 節 生理活性物質合成への応用

最後に、ホスホニウム塩 **24b** の有用性拡大を目的として、ホスホニウム塩 **24b** を用いた各種生理活性物質の合成検討を実施した (Scheme 3-10)。すなわち、本章、第 1 節に記載したとおり、 α , α -二置換アミノ酸や α , α -二置換アルコールを分子内に部分骨格として有する生理活性物質は数多く存在しており^{20,24,55-58)}、それら生理活性物質の合成に際し、今回調製したホスホニウム塩 **24b** を用いた新規合成法を確立することができれば、ホスホニウム塩 **24b** の有用性を証明できると考えた。



Scheme 3-10. Reagents and conditions: (a) aldehyde **25**, *n*-BuLi, THF, 77-99%; (b) H₂, Pd-C, MeOH; (c) KOH, MeOH, H₂O, 71-90% (2steps); (d) cyanogen bromide, K₂CO₃, THF, 69%.

私が行う fingolimod を基とした S1P₁ アゴニスト類縁体合成に関しては、Table 3-2 に示したように、本ホスホニウム塩 **24b** が様々な置換アリールアルデヒドと円滑に進行することにより、第 2 章で紹介したヘテロアリールを含む鍵中間体 **30** の効率的な合成と、迅速な SAR 取得を可能にするものであった。すなわち、ホスホニウム塩

24b をチオフェンやフラン、ピロールなどの各種ヘテロアリアルアルデヒド (**25f**, **25i**, **25j**) と反応させることにより得られるオレフィン体 (**20f**, **20i**, **20j**) は、続く接触還元により容易に鍵中間体 **30a-c**^{43a)} へと導くことができ、各種誘導体合成に利用可能であった (Scheme 3-6, eq. 1)。

また、第 2 章、第 1 節で述べた fingolimod のキラル類縁体として注目されている **28**³⁹⁾ の合成にも、本ホスホニウム塩 **24b** は利用可能であった (Scheme 3-6, eq. 2)。すなわち、安価に市販されているアルデヒド **25m** とホスホニウム塩 **24b** から導いたイリドを反応させた後、得られたオレフィン体の還元とアルカリ加水分解を行うことで目的とするアミノアルコール体 **28** を全 3 工程、70% 収率で得ることができた。

さらに、キョーリン製薬により報告されている S1P₁ アゴニスト **29**⁵⁸⁾ についても、アルデヒド **25m** の代わりにアルデヒド **25n**⁶⁴⁾ を用い、先と同様の反応を行うことで、容易に **29** を得ることができた (Scheme 3-6, eq. 3)。このように、別途調製した各種アルデヒドとホスホニウム塩との Wittig 反応、続く還元、アルカリ加水分解反応の全 3 工程を機械的に実施することにより、fingolimod から誘導される様々なアミノアルコール化合物を簡便に合成できることは、S1P₁ アゴニストの誘導体展開におけるホスホニウム塩 **24b** の利便性、有用性を立証するものであった。

また、本章、第 1 節で述べた TAAR1 アゴニストとして報告されている 4,5-dihydro-1,3-oxazol-2-ylamine 構造を有する **31**⁴⁹⁾ についても、本ホスホニウム塩 **24b** から容易に誘導することが可能であった (Scheme 3-6, eq. 4)。すなわち、ベンズアルデヒド **25a** との Wittig 反応生成物である **20a** を出発原料として、接触還元、続くアルカリ加水分解反応により導かれるアミノアルコール体に対し、ブロモシアンを作用させることでアミノオキサゾリン体 **31** を全 3 工程、69% 収率で得ることができた。

第 7 節 結語

本章では、S1P₁ アゴニスト活性の発現に重要なユニットであるキラルな四級炭素アミノアルコール骨格を持つホスホニウム塩 **24b** の合成と、その応用例について述べた。ホスホニウム塩 **24b** は、その調製自体に数工程を要する点や、各種アルデヒドとの Wittig 反応において、収率向上のために過剰量のホスホニウム塩が要求される点などのデメリットはあるものの、芳香族、脂肪族問わず様々なアルデヒドと反応し、中～高収率でオレフィン体を与える、優れた反応剤であった。特に、ホスホニウム塩 **24b** は立体障害が大きい芳香族アルデヒドや、対応するアリアルメチルハライドの調製が困難である電子豊富なアリアルアルデヒドとも問題なく反応し得るものであり、私が実施する S1P₁ アゴニスト探索研究における合成の効率化に貢献する、有用な反応剤であることが見出された。さらに、ホスホニウム塩 **24b** は、調製

が容易なアルデヒドをその反応相手とするコンバージョン合成法により、S1P₁アゴニスト化合物を代表とする各種生理活性物質の合成に利用可能である点においても優れていた。

また、ホスホニウム塩 **24b** と各種芳香族アルデヒドの反応は、ジアステレオ選択的に進行し、*E* 体のみを生成物として与えた。ジアステレオ選択的な化合物からは、その後の立体選択的な官能基導入が可能であり、ホスホニウム塩 **24b** は、 α,α -二置換 α -アミノ酸構造を有する多様な天然物合成に応用され得る反応剤であると言える。

第 4 章

微生物変換を利用した α,α -二置換 α -アミノアルコール化合物の効率的リン酸エステル化法

第 1 節 序論

前章までに述べてきたように、 $S1P_1$ アゴニストとして知られるアミノアルコール **6** や **28** はプロドラックとして機能することが知られている。すなわち、**6** や **28** 自身は $S1P_1$ アゴニスト活性を有しておらず、生体内に投与された後、血中内に存在するキナーゼにより化合物中の一級水酸基がリン酸エステル化され、**(S)-6-P** や **28-P** へと変換されてはじめて、 $S1P_1$ アゴニストとして機能する (Figure 4-1)。^{32,33)} 一方、 $S1P_3$ へのアゴニスト作用は、副作用である徐脈を誘発する可能性が強く示唆されており²²⁾、各化合物の $S1P$ 受容体選択性は化合物を選抜する上で非常に重要な評価基準である。それに伴い、 $S1P_1$ アゴニスト探索研究においては、 $S1P$ 受容体アゴニスト活性測定用にリン酸エステル体を別途合成することが必須であった。

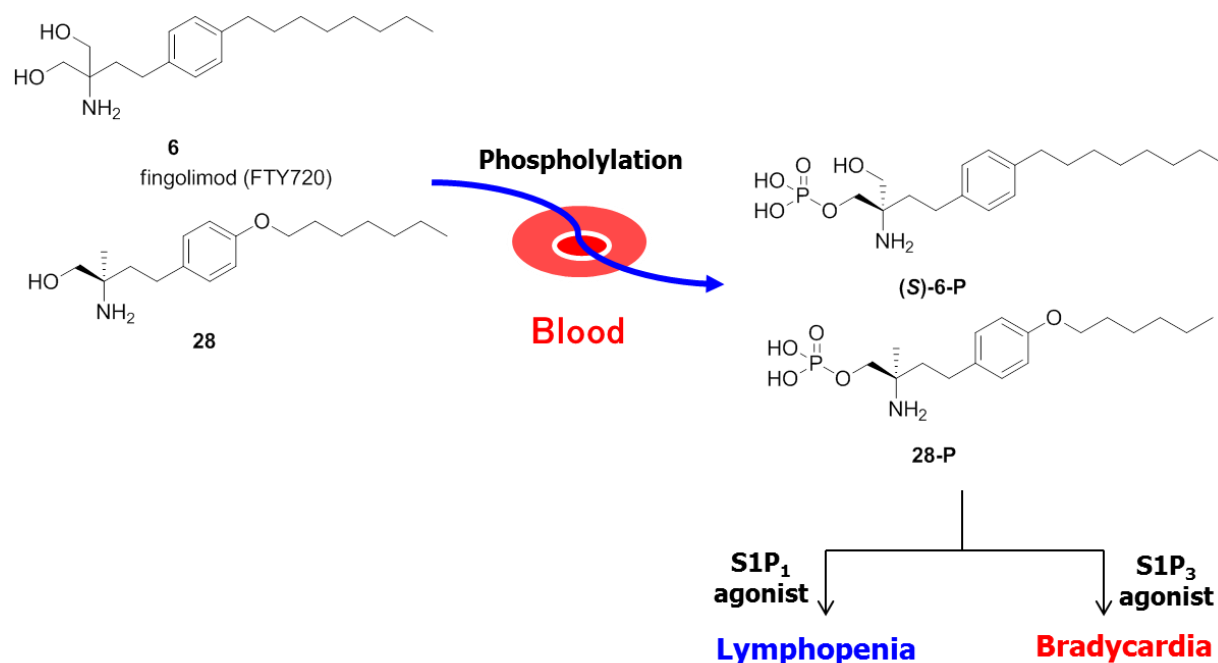
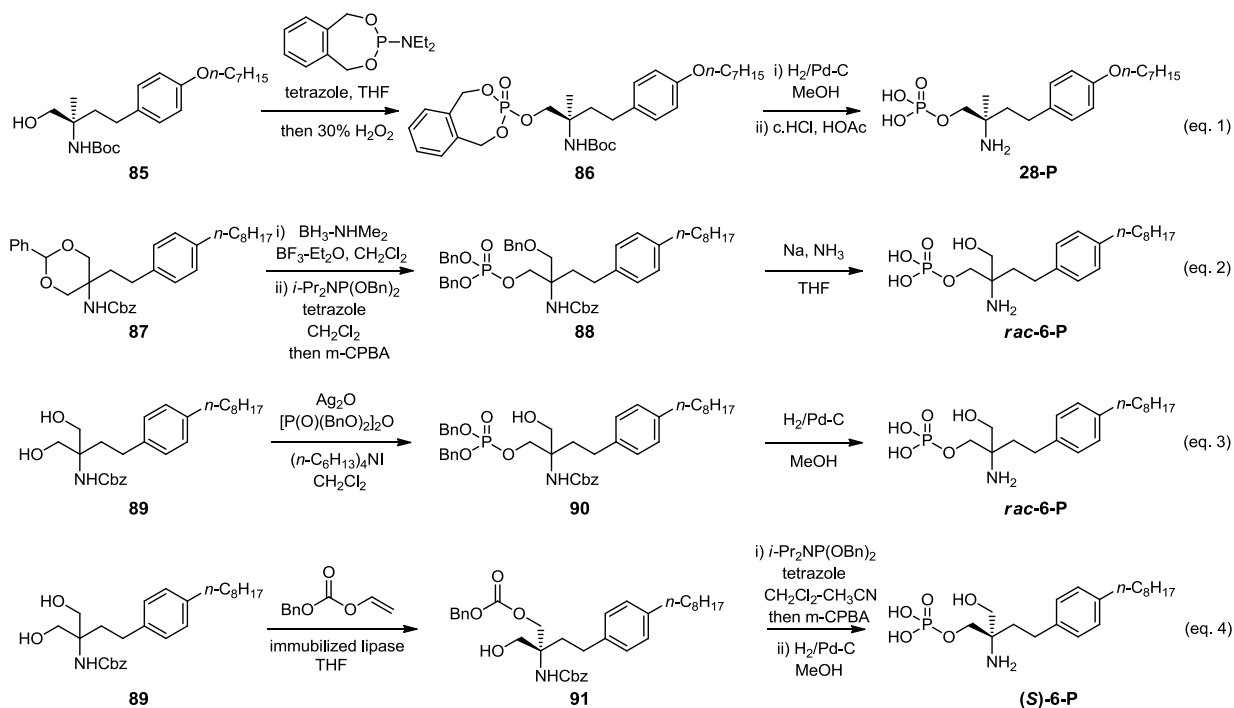


Figure 4-1. Phosphorylation of amino alcohol compounds (**6** and **28**) lead to biologically active compounds (**(S)-6-P** and **28-P**).

Fingolimod **6** を含めた S1P₁ アゴニスト研究の進展に伴い、親化合物であるアミノアルコール体から活性本体であるリン酸エステル体への製法検討は、今日まで、多くのグループにより実施されている。⁶⁵⁻⁶⁷⁾ Scheme 4-1 には、その一例として、fingolimod **6** と光学活性な S1P₁ アゴニスト化合物 **28** のアミノ保護体を出発原料にした場合のリン酸エステル体の合成法を示している。一般的なリン酸エステルユニットの導入法としては、eq. 1^{39b)}、eq. 2⁶⁵⁾ や eq. 4⁶⁷⁾ に示したように、分子内に存在する一級水酸基に対して三価のリン酸化試薬を反応させた後、酸化して目的の五価リン酸エステル体へと導く手法が挙げられる。その他にも、eq. 3 に示したように、5 価のリン試薬を用いた、酸化反応が不要でより直接的な合成法⁶⁶⁾ も開発されている。上記方法は、様々なアルコール体を出発原料とし、比較的短工程で目的のリン酸エステル体へと導くことが出来る優れた合成法であった。しかしながら、いずれの方法も、分子内に存在するリン試薬との反応点（一級水酸基）以外の反応性官能基（アミノ基など）の保護、脱保護が必須であり、多検体のスクリーニングを実施する際には、より直接的で簡便な手法が望まれていた。



Scheme 4-1. Chemical synthetic methods of amino alcohol compounds toward phosphorylated compounds.

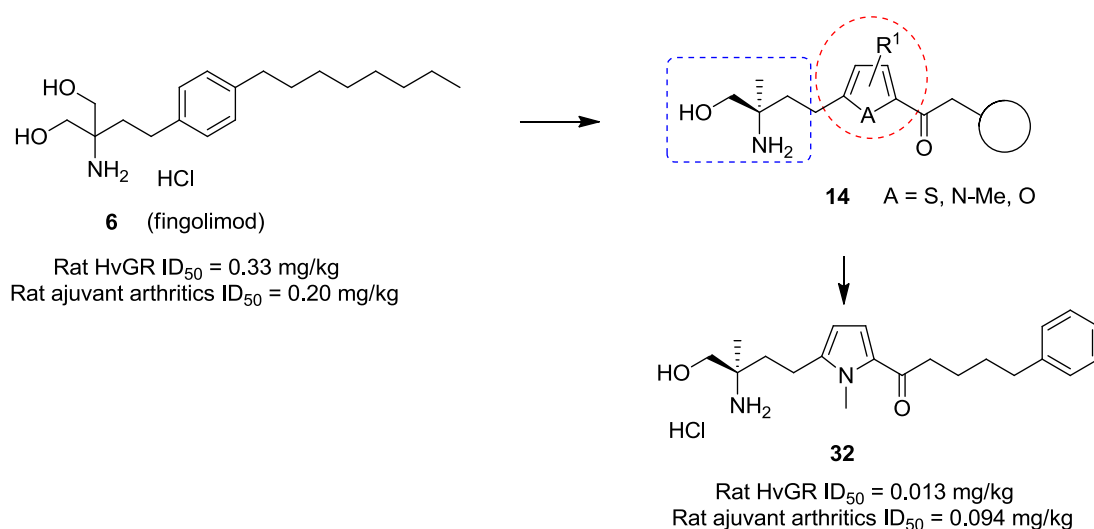
一方、私は通常の化学反応では達成し難い有力な合成法の一つとして、酵素や微生物などの生体触媒を化合物合成に応用する研究を行ってきた。中でも、第 2 章で

述べたように、酵素を用いた不斉非対称化反応は $S1P_1$ アゴニスト誘導体合成において、高付加価値原料である光学活性アルコールを簡便に得るための非常に有力なツールとなり得るものであった。²⁷⁾ 一般に、微生物は基質認識力を利用した代謝反応により化合物を変換する能力を持つため、その変換に際しては、分子内に存在する反応点以外の反応性官能基の保護を必要としない場合が多いことが知られている。³⁸⁾ そこで、このような特徴を持つ微生物反応に注目し、 $S1P_1$ アゴニストの親化合物であるアミノアルコール体から活性本体であるリン酸エステル体への効率的な合成法確立のため、微生物を利用した変換反応について検討を行うこととした。

本章では、親化合物（アミノアルコール体）から活性本体（リン酸エステル体）への直接的な変換を可能にする微生物の探索と、それにより確立した微生物変換法を用いた $S1P_1$ アゴニスト探索研究における多検体スクリーニング法の構築について述べる。

第 2 節 鍵中間体を用いたアミノアルコール体合成

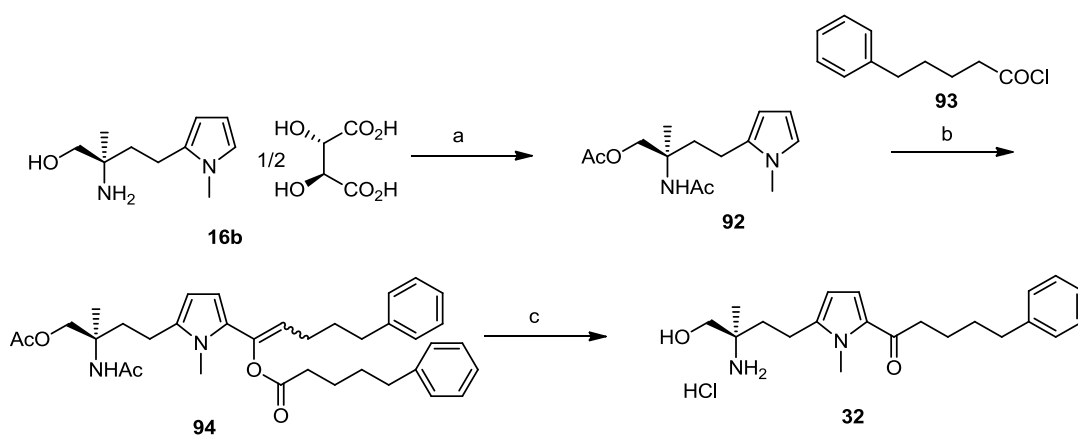
第 2 章でも紹介したように、fingolimod **6** を基にした構造変換の結果、一般式 **14** に示したような化合物群に、 $S1P_1$ アゴニスト作用に基づく強力な免疫抑制作用が認められている。中でも、中心環としてピロール環を有し、側鎖として 5-フェニルペンタノイル基を持つ **32** は、動物モデルを用いた各種実験により、非常に強力な *in vivo* 薬効を有することが明らかとなっている（Scheme 4-2）。



Scheme 4-2. Chemical modification of fingolimod **6** to potent active pyrrole compound **32**.

すなわち、**32** は臓器移植時の免疫抑制モデルの一つであるラット HvGR 試験における ID₅₀ 値が 0.094 mg/kg であったことに加え、慢性関節リウマチモデルの一つであるアジュバント関節炎試験においても、その ID₅₀ 値は 0.013 mg/kg であり、fingolimod **6** の活性を凌駕するものであった。そこで、この強力な薬効を示した **32** を反応基質として選定し、リン酸エステル体への微生物変換反応の検討を行うこととした。

反応基質として使用する **32** は、第 2 章で紹介した鍵中間体 **16b** を出発原料とし、Scheme 4-3 に従い合成した。^{24,43)}



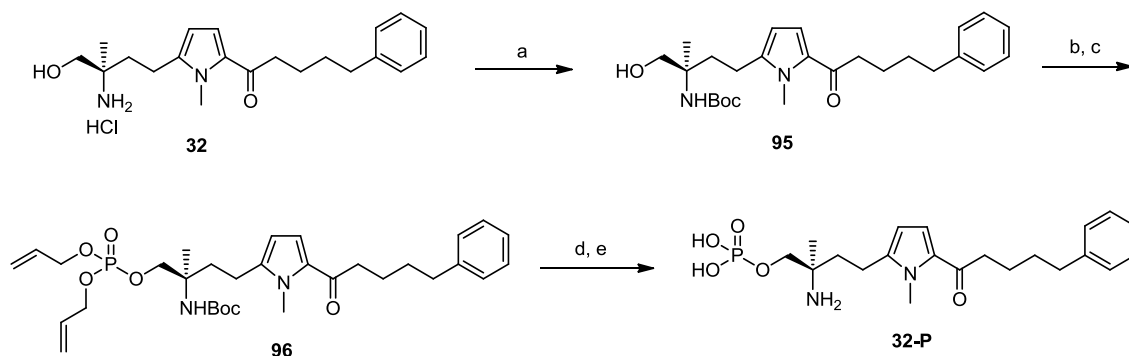
Scheme 4-3. Reagents and conditions: (a) aq. NaOH, CH₂Cl₂, then Ac₂O, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 100%; (b) **93**, DMAP, toluene, 45%; (c) i) LiOH, THF, MeOH, H₂O, 100%; ii) HCl-dioxane, MeOH, 79% (2steps).

まず、アミノアルコールのシュウ酸塩 **16b** を脱塩した後、ジクロロメタン中、トリエチルアミン存在下、無水酢酸を用いて水酸基とアミノ基のアセチル化を同時に行い、ジアセチル体 **92** を得た。続く、ピロール環 5 位のアシル化は、ルイス酸を用いた Friedel-Crafts 型の反応では重合反応が進行するのみで、目的とするアシル体は全く得られなかったが、その後の条件検討により、塩基性条件において目的のアシル化反応が進行することが判明した。⁶⁸⁾ すなわち、**92** に対し、トルエン中、酸クロリド **93** を加え、過剰量のジメチルアミノピリジン (DMAP) 存在下、110°C にて加熱処理することで、ピロール環 5 位にアシル化が進行した後、さらにもう一分子の酸クロリド **93** が付加したエノールエステル体 **94** が得られてきた。なお、エノールエステル体 **94** の安定性は高く、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる単離精製が可能であった。目的のアシル化反応は進行するようになったものの、本反応

は収率が 50%程度にとどまることや、アシル化に続いてエノールエステル化反応が進行するために過剰の酸クロリドが必要となる等の問題が残されていた。これらの問題点については、その後、私の所属する研究グループにより製法改良が行われ、本アシル化反応における過剰反応を抑制し、収率を向上させる条件を見出すことに成功している。^{43b,69)}最後に、アルカリ加水分解により **94** のエノールエステル基と二つのアシル基を同時に除去した後、塩酸塩として目的のアミノアルコール体 **32** を得た。

第 3 節 化学的リン酸エステル体合成法

続いて、Scheme 4-4 に従い、親化合物であるアミノアルコール体 **32** からリン酸エステル体 **32-P** への合成を行った。



Scheme 4-4. Reagents and conditions: (a) Boc_2O , NEt_3 , CH_2Cl_2 ;

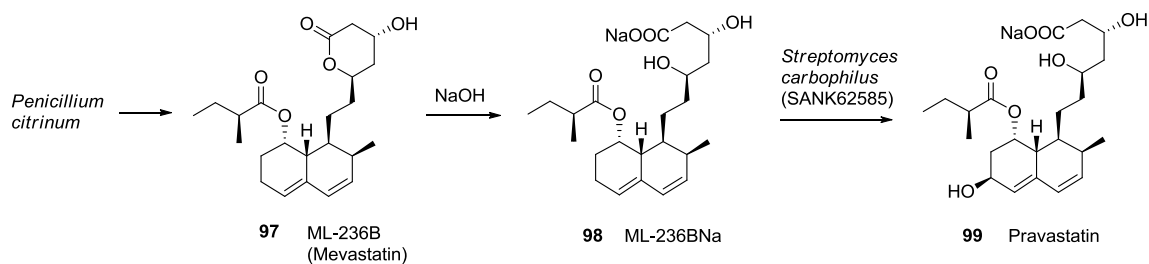
(b) $(\text{AllylO})_2\text{PN}(i\text{-Pr})_2$, tetrazole, AcOEt , H_2O ; (c) $t\text{-BuOOH}$, CH_2Cl_2 , 67% (3 steps); (d) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, pyrrolidine, CH_3CN ; (e) TFA , CH_2Cl_2 , 51% (2 steps).

リン酸エステルユニット導入は、既知合成法に従い、三価のリン試薬を用いて実施した。まず、アミノアルコール体 **32** のアミノ基を Boc 基で保護した後 (**95**)、テトラゾール存在下、三価のリン試薬であるジアリル *N,N*-ジイソプロピルホスホラミダイト ($(\text{AllylO})_2\text{PN}(i\text{-Pr})_2$) を反応させた。続いて *tert*-BuOOH を用いた酸化反応を行い、リン酸エステル上の水酸基がアリル基で保護されたリン酸エステル体 **96** を得た。得られた **96** に対し、アセトニトリル中、テトラキストリフェニルホスフィン存在下、ピロリジンを用いることでリン酸エステル上の二つのアリル基を除去した後、最後に TFA を用いてアミノ基上の Boc 基の脱保護を行い、目的のリン酸エステル体 **32-P** を得た。

第 4 節 微生物を利用したリン酸エステル化法

本章、第 1 節でも述べたように、上記した三価のリン酸化試薬を用いた化学的リン酸エステル合成法は、収率良く反応は進行するものの、その過程においてアミノ基やリン酸エステル上の水酸基の保護を必要とするものであった。そのため、従来のリン酸エステル体合成法は、構造が異なる多検体のスクリーニングが必要な探索段階においては効率が良い方法とは言えず、未だ改良の余地が残された方法であった。そこで、この多段階合成をより簡便に行う方法として、微生物を用いた直接的変換反応に注目した。

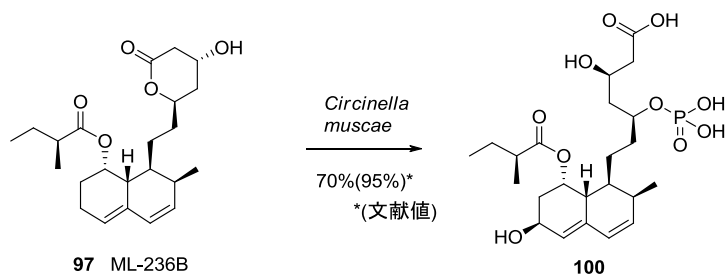
微生物変換とは、微生物の持つ代謝能を化合物変換に利用する反応であり、古くから光学活性中間体を含む天然物合成や、生体内代謝産物の合成などに応用されている。⁷⁰⁾ 近年、創薬化学における光学活性化合物構造の複雑化、多様化により、微生物を利用した化合物合成の需要は増加傾向にあり、多くの企業、研究機関で活発に研究が行われている分野である。⁷⁰⁾ 中でも、通常の化学合成では取得困難な化合物の代替合成法としての価値は非常に高く、例えば、三共（現第一三共）から市販されている Pravastatin **99** の発見、合成においては、*Penicillium citrinum* や *Streptomyces carbophilus* などの菌類が非常に重要な役割を果たしており、実際に、放線菌の一種である *Streptomyces carbophilus* を利用した微生物変換反応は Pravastatin **99** の工業的合成にも応用されている (Scheme 4-5)。⁷¹⁾



Scheme 4-5. Synthetic route of Pravastatin **99**.

微生物を用いたリン酸エステル化反応自体は、これまでもいくつかの報告例⁷²⁾があったが、基質に α,α -二置換アミノアルコール類を用いた微生物リン酸エステル化反応は報告されていなかった。そこで、実際の化合物を用いた微生物スクリーニングに先立ち、検索ツールを用いたリン酸エステル変換能を有する微生物の調査を実施した。⁷³⁾ その結果、ML-236B **97** を基質としたリン酸エステル変換菌として真菌の一種である *Circinella* 属⁷⁴⁾を用いた反応例が見出された (Scheme 4-6)。実際

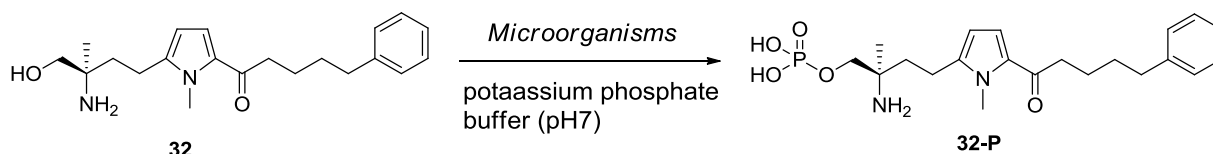
にヒットした変換反応の検証実験を行ったところ、反応完結には 6 日間と非常に長時間を要するものの、約 70%の収率で目的のリン酸エステル体 **100** が得られることが判明した。そこで、見出された *Circinella* 属の周辺菌体を中心に、各種菌体について、アミノアルコール化合物 **32** に対するリン酸エステル変換能の検討を開始した。



Scheme 4-6. Phosphorylation of **97** with *circinella muscae*.

第 5 節 微生物を用いたアミノアルコール体からのリン酸エステル体合成

アミノアルコール体 **32** からリン酸エステル体 **32-P** への変換反応について、当時所有していた放線菌、糸状菌、細菌からなる 106 株のスクリーニングを実施した。なお、本変換反応では、文献記載の培地条件⁷⁴⁾にリン酸バッファーを添加することにより収率の向上が認められたため、以後の検討には見出されたリン酸バッファー添加条件を用いている。各種微生物を用いたリン酸エステル化反応の結果を Table 4-1 に示した。

Table 4-1. Biotransformation of **32** to phosphorylated compound **32-P**.

Entry	Microorganisms	Conversion (%) ^a
1	<i>Circinella muscae</i> (NBRC 4457)	82
2	<i>Circinella muscae</i> (NBRC 6410)	58
3	<i>Circinella minor</i> (NBRC 4454)	42
4	<i>Circinella minor</i> (NBRC 6448)	75
5	<i>Circinella mucoroides</i> (NBRC 4453)	57
6	<i>Circinella mucoroides</i> (NBRC 4455)	15
7	<i>Circinella umbellate</i> (NBRC 4452)	45
8	<i>Circinella umbellate</i> (NBRC 5842)	92
9	<i>Circinella umbellate</i> (NBRC 6413)	80
10	<i>Absidia cylindrospora</i> (NBRC 4000)	5

^a The conversion ratio was determined by the peak-area ratios of alcohol **32** and phosphate **32-P** using HPLC. The details are shown in experimental sections.

検討の結果、検索ツールより得られた結果同様、糸状菌の多く（特に *Circinella* 属）にリン酸エステル化能が見出された。中でも、*Circinella muscae* (NBRC 4457) や *Circinella umbellate* (NBRC 5842) などの菌体は、それぞれ 82%、92%と非常に高収率で目的のリン酸エステル体を与えた（Entry 1, 8）。検討を行った菌体の中で、*Circinella muscae* (NBRC 4457) が反応性、入手性等を含めて総合的に優れていたため、続いて、収率、反応性向上を目的として *Circinella muscae* (NBRC 4457) を用いたリン酸エステル化反応の条件検討を実施した。

まず、菌体の状態が反応効率に与える影響について検討した。一般に、微生物は、その状態により反応性が変化する可能性があることが知られており³⁸⁾、今回見出した糸状菌 *Circinella muscae* (NBRC 4457) についても、その状態を変化させることで反応性を向上できると考えた。そこで、これまでの液体培養状態での菌体に加え、休止菌体、凍結乾燥菌体を用いた反応についての検討を実施した。その結果、Figure 4-2 (a) に示したように、培養液をそのまま変換反応に使用した場合（液体培養）に比べ、培養液をリン酸バッファーへと変換して反応（休止菌体）することで反応性が格段に向上することが判明した。また、菌体を凍結乾燥状態にすることにより、さらに反応性が向上した。特に、凍結乾燥状態の菌体を用いて、基質濃度 100 μg/ml で反応させた場合には、当初、反応完結に数日間かかっていた反応を 2 時間まで短縮させることに成功した。なお、凍結乾燥状態にすることで反応性が向上した理由

については、真相は未だ不明であるものの、現在、以下のような可能性を考えている。すなわち、凍結乾燥状態の菌体が反応溶媒であるリン酸バッファーに懸濁し易くなった（反応環境場の変化）、あるいは、凍結乾燥時、菌体の核膜が破壊され反応点があらわになることで菌体自体の反応性が向上した（菌体自体の反応性の変化）、などを考えている。さらに、一度凍結乾燥状態にした菌体は、そのままの状態での冷凍保存が可能であり（Figure 4-3 (a)）、保存後の菌体はリン酸バッファー溶液に懸濁させることで、直ちに目的とするリン酸化反応に用いることが可能であった（Figure 4-3 (b), (c)）。このように、菌体を凍結乾燥状態にすることは、反応性向上のみならず、菌体の用時調製を不要とし、操作性向上にも貢献するものであった。

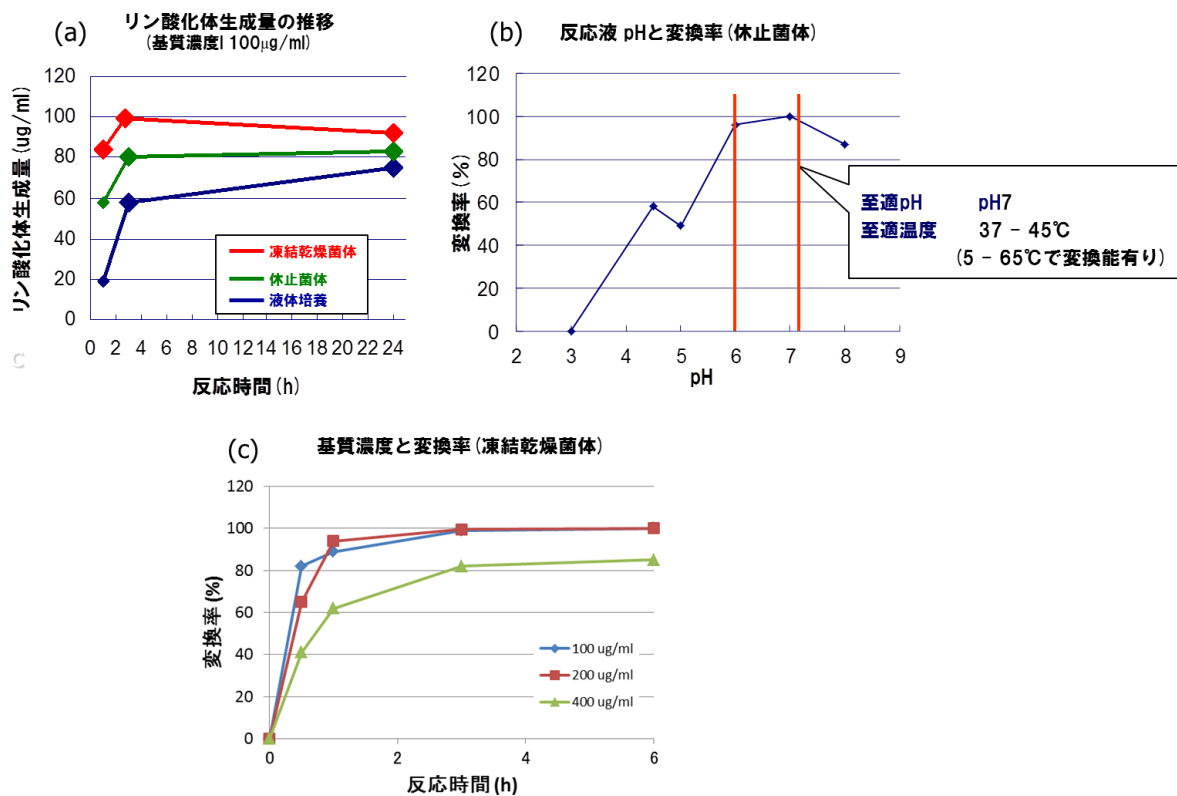


Figure 4-2. The coloration between several conditions and the rate of phosphorylation from 32 to 32-P; (a) the states of fungus, (b) the pH value of the solvent, (c) the concentration of 32.

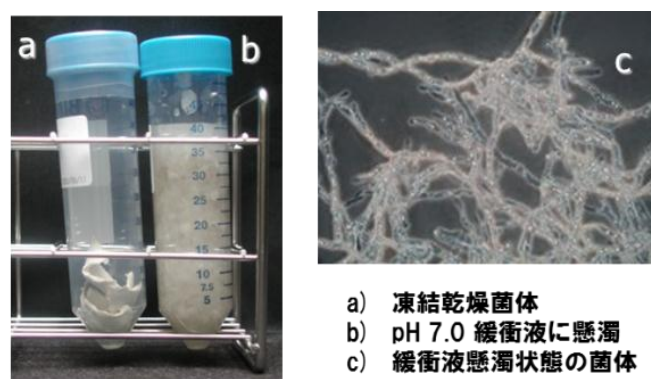


Figure 4-3. The feature of freeze-drying a strain, *Circinella muscae* (NBRC 4457).

また、反応溶液の pH もリン酸エステル体変換率に影響を与えることが判明した。すなわち、Figure 4-2(b)に示したように、反応液の pH 値により生成するリン酸エステル体の変換率は大きく変動し、pH 値が 6~7 の中性領域であるときに最も高い変換率を与えた。反応温度についても検討を行った結果、5°C から 65°C の間であれば本反応は進行し、最適温度は 37°C から 45°C の間であることを確認した。

続いて、基質濃度が本微生物反応に与える影響について検討した (Figure 4-2(c))。その結果、基質濃度は反応性に影響を与え、基質濃度が 200 $\mu\text{g/ml}$ までは高い反応性を維持したが、それを超えると反応速度が低下し、400 $\mu\text{g/ml}$ の基質濃度で反応を行った場合には、約 80% 前後の変換率で頭打ちとなり、6 時間以上反応を行っても原料は消失しないことが明らかとなった。

以上のように、最適な pH、反応温度、基質濃度を見出すことに成功し、得られた最適条件を本微生物反応に適用することで大幅な反応時間短縮と収率向上を達成した。

続いて、得られるリン酸エステル体の精製方法の改良を行うことにした。すなわち、本微生物反応により得られるリン酸エステル体の物性は非常に悪く、その精製に汎用的精製手法である順相シリカゲルカラム精製法を使用することは困難であった。そのため、化合物精製は、再結晶（または再沈殿）法、もしくは逆相シリカゲルカラム精製法により行う必要があった。再結晶法は、一度条件を決めることができれば大量合成にも適用可能な優れた精製法である一方、溶媒条件選定のために多くの時間を要し、多検体合成を必要とするスクリーニング段階では不向きな手法であると考えられた。そこで、逆相シリカゲルカラム精製を用いた簡便なリン酸エステル体の精製法確立を目的に Mass-Based fraction collection system を構築することにした。⁷⁵⁾ 精製システムは以下のような構成にした (Figure 4-4)。

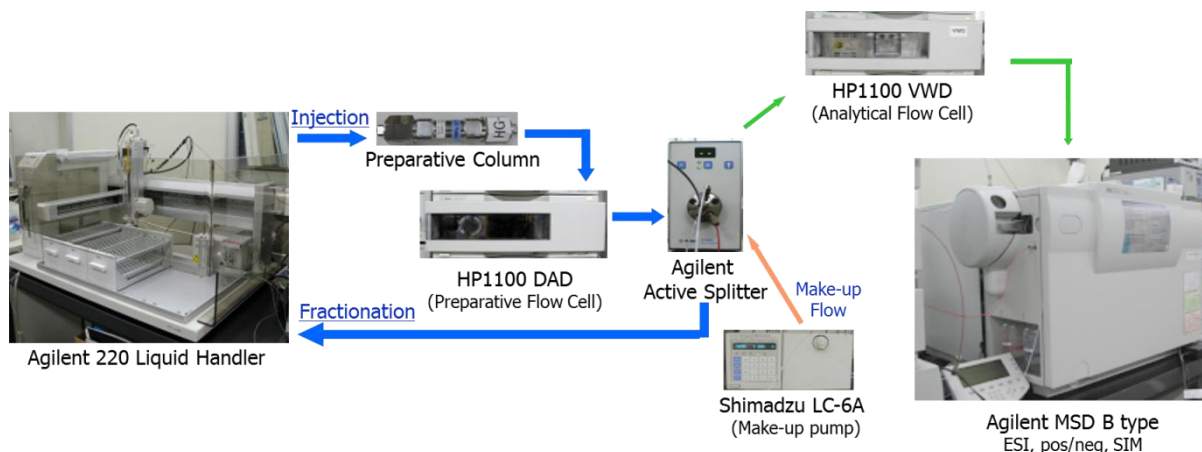


Figure 4-4. Mass-Based fraction collection system for the purification of phosphorylated products.

まず、オートサンプラーを用いてリン酸エステル体の粗生成物の自動インジェクションを行い、逆相液体カラムクロマトグラフィーによる精製を行った。分離精製後、溶液の一部をスプリッターにより分離し、質量分析計でその分子量を測定した。予め設定した分子量を検出した送液分について、フラクションコレクション装置を用いた自動分取を行うことで、高純度のリン酸エステル体を得ることに成功した。なお、本システムでは、事前に入力（設定）した分子量のみを収集することが可能であり、これにより、同一メソッドでの簡便な自動精製を実現することができた。

今回構築した微生物反応によるリン酸エステル化反応と、続く自動精製システムを用いて、多検体スクリーニング合成を実施した。まず、**32** 以外のアミノアルコール化合物に対して、今回見出した微生物変換反応に付したところ、本変換反応は高い汎用性を有し、各種アミノアルコールから対応するリン酸エステル体への変換が可能であることが判明した。Figure 4-5 には、変換反応に使用したアミノアルコール体の一例を示している。このように、リン酸エステル体への変換反応は、中心母核や側鎖がピロール環やアルキルカルボニル基に限定されず、チオフェン環を有する **101** や、側鎖としてアルキニル基を有する **102** などに対しても有効であることが明らかとなった。さらに、微生物反応により得られる粗生成物は、続く自動精製システムを用いた精製が可能であり、高純度のリン酸エステル体を簡便に得ることに成功した。

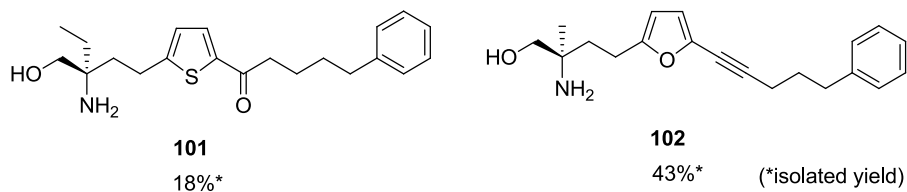


Figure 4-5. Phosphorylation of various amino alcohol compounds with *cininella muscae* (NBRC 4457).

第 6 節 結語

本章では、S1P₁アゴニストの親化合物であるアミノアルコール化合物から活性本体であるリン酸エステル体を合成する手法として、微生物を用いた変換反応について述べた。各種検討の結果、目的とするリン酸エステル化反応を効率的に行う微生物として、糸状菌の一種である *Circinella* 属を見出した。中でも、リン酸化効率、入手性等に優れた *Circinella muscae* (NBRC 4457) を見出すことに成功した。また、反応溶液の pH や温度の調節に加え、凍結乾燥状態の菌体を使用する等の改良を行うことで、本微生物変換反応の反応性、収率を飛躍的に向上させることに成功した。さらに、質量分析計と連動させた液体クロマトグラフィー精製システムと組み合わせることで、微生物変換により得られるリン酸エステル体を簡便に精製することが可能となった。この微生物変換反応と自動精製システムの組み合わせは、様々なアミノアルコール体のリン酸エステル体合成に適用可能であり、その結果、多検体スクリーニング用の汎用性が高い合成法を構築することに成功した。

今回確立した微生物変換反応は、従来の全 4 工程を要する化学変換法と比較して、その過程において保護、脱保護を要せず、全 1 工程、高収率で目的とするリン酸エステル体を与える手法であり、合成の効率化に加え、グリーンケミストリーの観点でも非常に優れた手法であった。微生物を用いた化学変換反応は、本章で紹介したような合成の効率化への寄与はもちろんのこと、通常の化学合成では達成し得ない反応の代替手法としても、その価値は高く評価されている。今回の結果を含む、様々な微生物を用いた反応結果の蓄積と、新たな菌体収集を含むライブラリー構築等を行うことで、微生物変換反応は更に有用な合成ツールとして利用できるものであり、今後の更なる発展が期待される。

第 5 章

短半減期型 S1P₁ アゴニストを志向したエーテル化合物の探索研究

第 1 節 序章

第 1 章で述べたように、S1P₁ アゴニストとして働く fingolimod はこれまでの免疫抑制薬とは全く異なった新規の作用メカニズムに基づいて強力な免疫抑制作用を発現する薬剤である。一方で、その S1P 受容体サブタイプへの選択性は低く、主に S1P₃ アゴニスト活性に基づくと考えられる一過性の徐脈を副作用として有している。^{76,77)} 近年、fingolimod とその周辺化合物を含めた S1P 受容体研究の進展に伴い、S1P₃ アゴニスト活性を除くだけでは徐脈回避には不十分であるとの報告があるもの⁷⁸⁾、今なお、多くの研究機関では、徐脈リスクの少ない免疫抑制薬取得のための戦略として、S1P₁ 選択的なアゴニスト活性を持つ化合物の探索研究が行われている。⁷⁹⁾

私の所属する研究チームも例外ではなく、前章までに紹介した新規合成法を活用することで、fingolimod **6** の周辺化合物について効率的な SAR 取得を実現し、その結果、一般式 **14** に示す化合物群の中から、S1P₃/S1P₁ 選択性に優れ、徐脈リスクの少ない S1P₁ アゴニスト化合物である臨床開発化合物 **10** (CS-0777) を獲得するに至っている (Figure 5-1)。^{24c)}

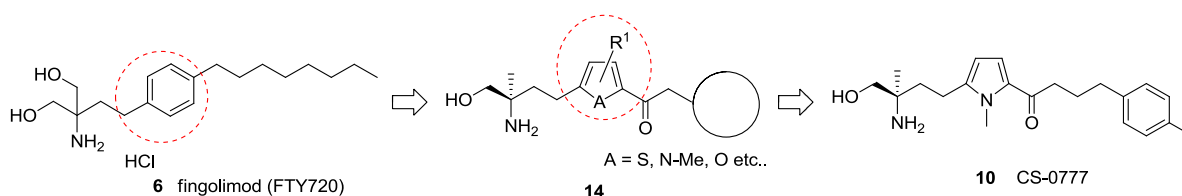


Figure 5-1. Identification of our clinical candidate **10** (CS-0777).

臨床開発化合物 **10** を獲得する一方で、**10** とは異なるプロファイルを持つ化合物の獲得も求められていた。一般に、創薬研究の探索段階において異なるプロファイルを持つ化合物を複数用意することは、創薬の成功確率向上のために重要な仕事である。そこで、**10** に代表されるヘテロ芳香環を含む化合物群 **14** とは異なるプロファイルを持つ化合物の獲得を目指し、継続して探索研究を実施した。

研究を継続するにあたり、まず、fingolimod が有する作用時間の長さに着目した。すなわち、fingolimod は非常に長時間体内に貯留することが判明しており、臨床試験結果によると、ヒトにおける化合物投与後の血中薬物濃度が半減する期間（半減期 = $T_{1/2}$ ）は 5.8 日から 7.6 日とされている。⁸⁰⁾ 同様に、**10** も比較的長い半減期を持ち、その後実施された臨床試験でのヒトにおける半減期は 171 時間（7.1 日）か

ら 211 時間 (8.8 日) と、fingolimod と同程度の結果であった。⁸¹⁾ 長時間の薬効持続は望ましい面もある一方で、長すぎる半減期は予期せぬ副作用を生じた際の安全性担保の観点で懸念が大きく、一般に、適度な半減期を有する化合物が臨床の現場ではより用いやすく、望ましい薬剤といえる。そこで、fingolimod よりも短く適度な半減期を持ちつつ、fingolimod が持つ副作用 (一過性の徐脈) のない S1P₁ 選択的アゴニスト化合物獲得を目的とした探索研究を開始した。

始めに、血中半減期短縮のための化合物デザインとして、fingolimod の骨格内に代謝され易い部分骨格を意図的に導入することを考えた。すなわち、fingolimod **6** の中心ベンゼン環とアミノアルコール部位を繋ぐメチレン鎖中に酸素原子を導入し、アルキル側鎖末端にメチルフェニル基を有する **33** を基本テンプレートとしてデザインした (Figure 5-2)。

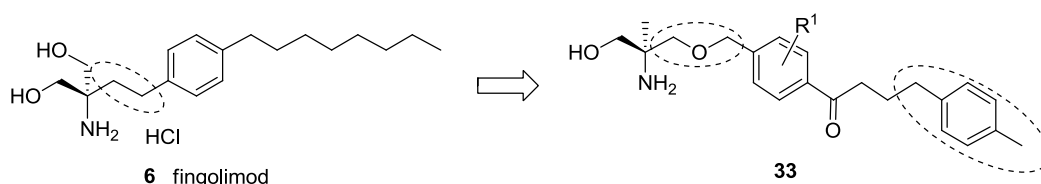
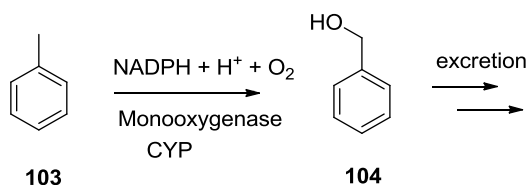


Figure 5-2. Structures of fingolimod **6**, and newly designed templates **33**.

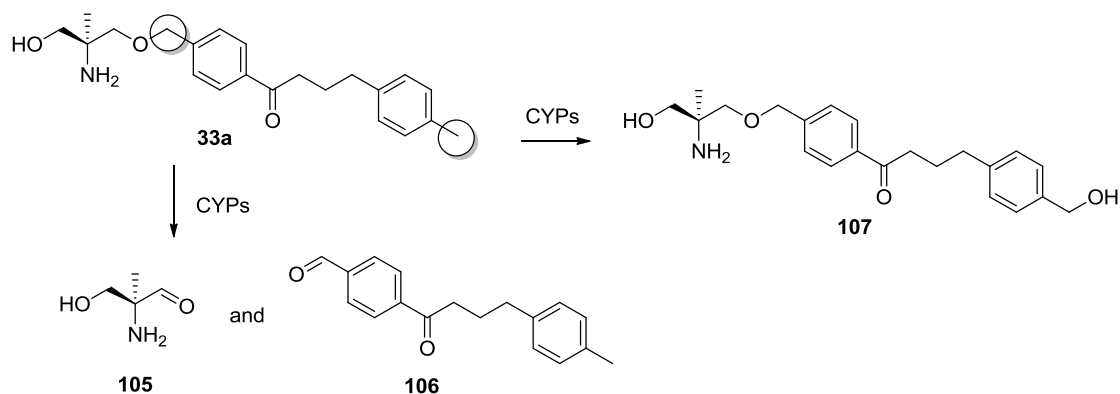
π 系隣接位に存在する炭素は通常のアシル基と比べ CYP による酸化代謝を受けやすく、各種化合物中のベンジル位やアリル位などは、生体内における主代謝部位として広く認識されている。⁸²⁾ 例えば、生体内に投与されたトルエン **103** は CYP によりベンゼン環上に存在するメチル基が酸化代謝を受け、全体の 95% がベンジルアルコール **104** へと変換された後、更なる代謝、抱合を経て、最終的に体外へと排出される (Scheme 5-1)。



Scheme 5-1. Metabolic pathway of toluene **103**.

ベンジル位が代謝されやすいという一般的事例に加え、今回新たにデザインした化合物の代謝されやすさは、代謝予測ソフト⁸³⁾を用いた計算によっても裏付けら

れるものであった。すなわち、専用の代謝予測ソフトを用いて、中心ベンゼン環に置換基を持たない基本となるエーテル体 **33a** について代謝予測を行ったところ、様々な CYP 種により、主にベンジル位が酸化的代謝を受けた代謝物 (**105**、**106**、**107**) を与えるという計算結果が得られた (Scheme 5-2)。



Scheme 5-2. Calculated metabolic pathway of our compound **33a**.

また、デザインしたエーテル化合物 **33** は、薬物動態面だけでなく、合成面においても利点があると考えられた。すなわち、**33** の合成においては、既にその合成法が確立している光学活性なアルコール体 **26** (or **56**) と、比較的合成が容易なベンジルアルコールから誘導される **108** との単純なアルキル化反応による合成が可能であり、その結果、中心ベンゼン環上の SAR 情報の早期取得も可能になることが期待された (Figure 5-3)。

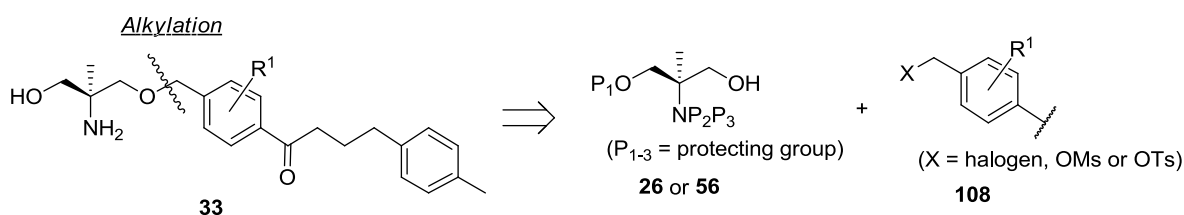


Figure 5-3. Retrosynthetic pathway of compound **33**.

なお、今回デザインした **33** は fingolimod と比較して、極性部位と中心芳香環の距離が伸長したものになっているが、類似の化合物は、当時、キョーリン製薬の報告の中に存在していた。⁸⁴⁾ その化合物は極性残基としてアミノジオール構造を持ち、脂溶性側鎖には硫黄原子で繋がれたベンジルエーテル構造を持つ化合物であった (Figure 5-4)。詳細なデータの記載は省略するが、社内実験の結果、このアミノジ

オール体 **109** は強い免疫抑制活性を持ちつつ、心臓への影響が少ないことが判明していた。上記結果を受け、炭素鎖を伸ばすことによる心臓への毒性改善も期待される化合物としてエーテル化合物 **33** をデザインするに至った。

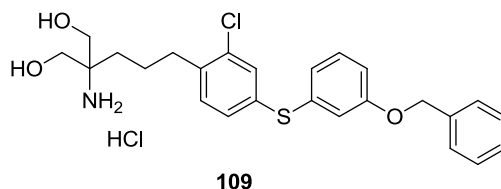


Figure 5-4. S1P₁ agonist compound **109** with three carbon length between amino alcohol moiety and central benzene ring.

第 2 節 エーテル化合物について

実際の誘導体展開を始めるにあたり、最も基本的な無置換ベンゼン体 **33a** の S1P 受容体への選択性、*in vivo* 薬効を測定し、エーテル体 **33** のポテンシャルを評価することとした。化合物の各 S1P 受容体へのアゴニスト活性は、対照化合物として fingolimod **6** を用い、それぞれのリン酸エステル体の S1P₁ と S1P₃ への結合活性を測定⁸⁵⁾ することにより決定した。その結果を Table 5-1 に示した。

Table 5-1. *In vitro* agonist-evoked GTPγ-S binding of phosphates of fingolimod **6-P** and ether compound **33a-P** to human S1P₁ and S1P₃

Compound	EC ₅₀ (nM) ^a		Selectivity (S1P ₃ /S1P ₁)
	S1P ₁	S1P ₃	
6-P	7.0	2.0	0.29
33a-P	7.0	200	29

^a EC₅₀ is defined as the midpoint between the binding or inhibitory ratio of the vehicle and the maximum response of the test compound.

既述したように、fingolimod のリン酸エステル体 **6-P** は S1P 受容体への選択性はなく、S1P₃/S1P₁ 選択性は 0.29 倍であった。一方、今回デザインしたエーテル化合物 **33a-P** は、fingolimod と比較して、その S1P₁ 結合活性は維持しつつ (EC₅₀ = 7.0 nM)、S1P₃ 結合活性が低下しており (EC₅₀ = 200 nM)、その結果、fingolimod よりも S1P₃/S1P₁ 選択性に優れ、29 倍の選択性を持つ化合物であることが明らかとなった。

続いて、**33a** のラット *in vivo* 薬効とその血中半減期について調べた (Table 5-2)。

Table 5-2. *In vivo* profiles of fingolimod **6** and benzyl compound **33a**.

Compound	Rat lymphopenia (% control at 0.1 mg/kg)	Rat HvGR (ID ₅₀ ; mg/kg) ^a	T _{1/2} (h) ^b
6	21	0.33	32
33a	40	0.27	7.8

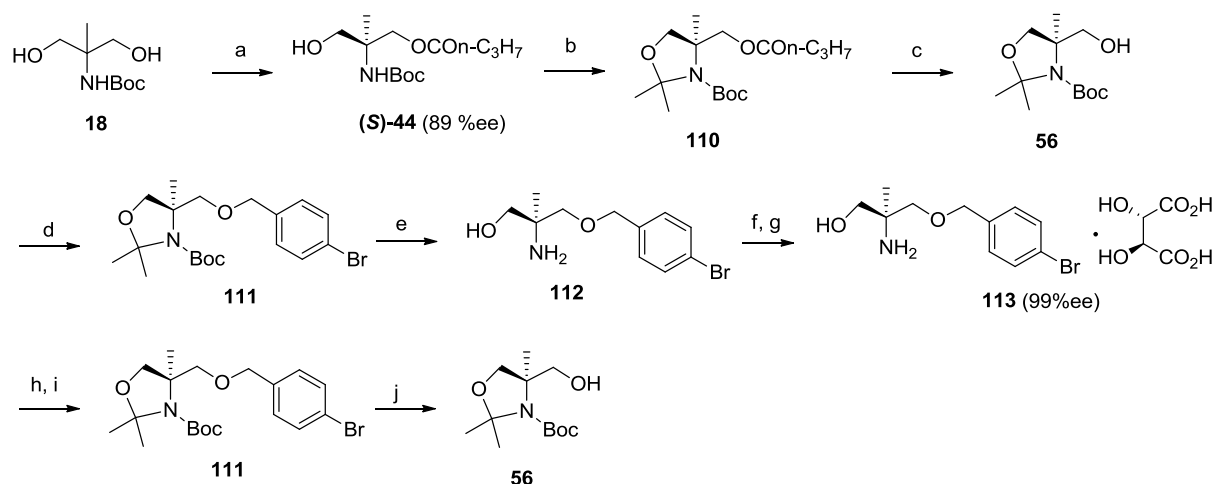
^a ID₅₀ is determined by results of at least three different doses.

^b Half-life of each compound was determined by the concentration of phosphate **6-P** or **33a-P** in plasma after dosing of compound **6** or **33a** in rats (p.o., 1.0 mg/kg, n = 2), respectively.

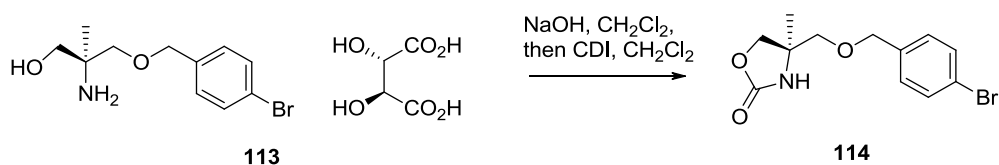
Table 5-2 に示したように、**33a** の血中半減期は 7.8 時間であり、当初の狙い通り fingolimod **6** より短くなっている一方で、その *in vivo* 薬効は fingolimod **6** とほぼ同等であることが判明した。すなわち、*in vivo* 薬効の指標の一つであるリンパ球減少試験において、**33a** は非常に強力な薬効を示し、化合物 0.1 mg/kg を皮下注射投与後 4 時間の時点でリンパ球を 40% まで減少させた。さらに、臓器移植モデルの一つである HvGR 試験においても、**33a** は強力な抑制作用を示し、その ID₅₀ 値は 0.27 mg/kg と、fingolimod **6** が示した 0.33 mg/kg という値を凌駕するものであった。以上の結果は、今回デザインした **33** が、*in vitro*、*in vivo* 両面において高いポテンシャルを有することを証明するものであった。

第 3 節 アミノアルコール体合成

光学活性中間体 **56** の合成は、第 2 章で紹介した酵素を用いる不斉非対称化反応を利用することとし、Scheme 5-4 に示す方法に従い実施した。^{27,43)} すなわち、第 2 章、Scheme 2-8 に示した CHIRAZYME L-2 を用いる方法により、アルコール体 **56** を得た後、以下に示す再結晶操作により、その光学純度を向上させた。まず、**56** の一級水酸基をベンジル保護した後、酸性条件下にて、アセタールが除去されたアミノアルコール体 **112** とし、その後、等量の D-(-)-酒石酸を加えて 1:1 有機塩 **113** とした。得られた **113** に対し、水を溶媒とした再結晶操作を行うことで、その鏡像体過剰率を 99% 以上まで上げることに成功した。なお、**113** の鏡像体過剰率は、Scheme 5-5 に従ってオキサゾリジノン体 **114** へと変換した後、HPLC 測定を行い決定している。その後、**113** のアミノアルコール部位をアセタール環化と Boc 化により保護した後、接触還元により一級水酸基上のベンジル基の脱保護を行い、光学純度の高いアルコール中間体 **56** を得ることに成功した。

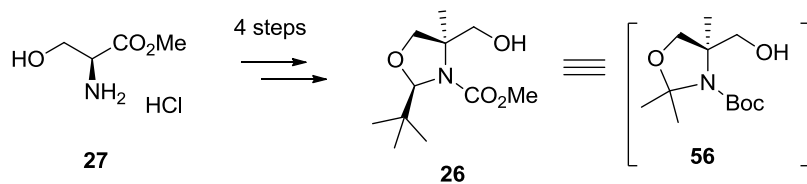


Scheme 5-4. Reagents and conditions: (a) CHIRAZYME L-2, carrier-fixed C3, Iyo, Vinyl *n*-butylate, *t*-BuOMe, 66% (89% ee); (b) acetone dimethylacetal, BF₃-OEt₂, CH₂Cl₂; (c) NaOH aq., THF, MeOH, 72% (2 steps); (d) 4-Bromobenzylbromide, NaH, DMF, 99%; (e) TFA, CH₂Cl₂, then H₂O, 88%; (f) D-(-)-Tartaric acid, EtOH, 70%; (g) Recrystallization from H₂O, 70%, 99% ee; (h) 1M NaOH aq. then Boc₂O, Et₃N, CH₂Cl₂, 90%; (i) Acetone dimethylacetal, BF₃-OEt₂, CH₂Cl₂, 94%; (j) H₂, 10% Pd-C, K₂CO₃, EtOH, 91%.



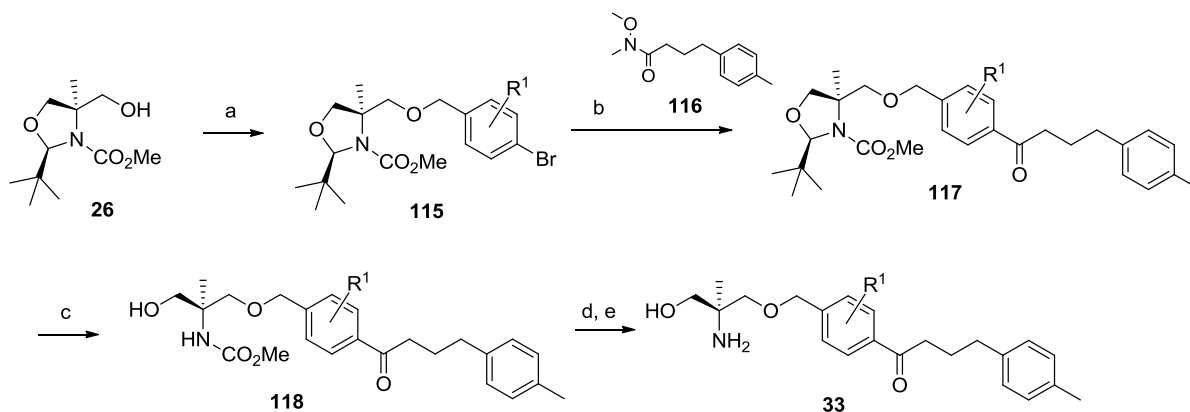
Scheme 5-5. Synthesis of oxazolidinone compound to determine the ee value of compound **113**.

また、光学活性アミノアルコール体は、第3章でも紹介した改良法である Seebach アルキル化法によっても構築可能であり、Scheme 5-6 に示すように、L-serine 塩酸塩 **27** から全4工程でアルコール体 **26** を合成し、鍵中間体として使用した。⁵⁰⁾



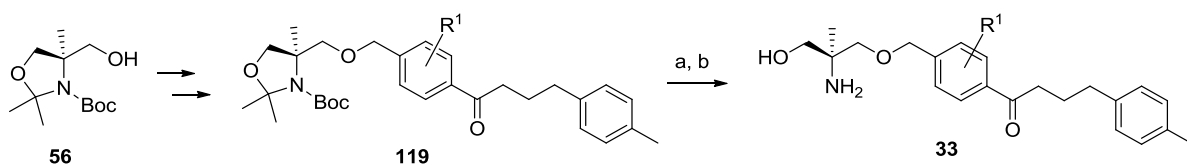
Scheme 5-6. Synthesis of key intermediate alcohol **26** from **27**.

中心ベンゼン環と、続く脂溶性側鎖の導入は Scheme 5-7 に示す方法で実施した。まず、アルコール体 **26** に対して、DMF 中 NaH を用いて、各種置換基を有する 4-ブロモベンジルハライドを作用させ、**115** を得た。**115** のブロモ基に対し、*n*-BuLi を用いたハロゲン-リチウム交換を行った後、対応する側鎖部位を有する Weinreb amide **116** と反応させ、**117** を得た。最後に、**117** のアミノアルコール部位に架かった *tert*-ブチルメチリデンを *p*-TsOH を用いて脱保護した後 (**118**)、続いて、水酸化カリウムを用いてアミノ基上のメチルカルバメート基を加水分解し、目的のアミノアルコール体 **33** を得ることに成功した。なお、得られた **33** は塩酸、またはシュウ酸を用いて塩化した後、各種 *in vivo* 試験に使用している。



Scheme 5-7. Reagents and Conditions; (a) benzylbromide, NaH, DMF, 64-95%; (b) *n*-BuLi, Weinreb amide **116**, THF, 45-95%; (c) *p*-TsOH monohydrate, MeOH, 55-96%; (d) KOH, EtOH, 90-100%; (e) HCl or oxalic acid, EtOH, 86-99%.

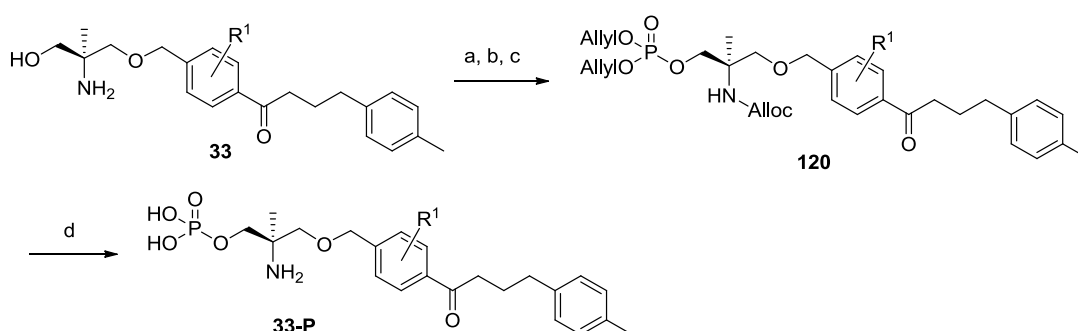
また、**26** の代わりに、Scheme 5-4 に示した酵素反応により調製した **56** を光学活性アルコール中間体として用いた場合には、**119** のジメチルアセタール基と Boc 基の脱保護は Scheme 5-4 (**111** → **112**) に示す方法により行い、その他の反応については Scheme 5-7 に準じて実施した (Scheme 5-8)。



Scheme 5-8. Reagents and conditions: (a) TFA, CH_2Cl_2 , then H_2O ; (b) HCl or oxalic acid, EtOH, 50-78% (2 steps).

第 4 節 リン酸エステル体合成

S1P 受容体アゴニスト活性の測定に必要なリン酸エステル体の合成は、第 4 章、Scheme 4-4 で紹介したルートとほぼ同様な方法で行った (Scheme 5-9)。まず、**33** のアミノ基を allyl chloroformate (AllocCl) で保護した後、一級水酸基をリン酸エステルへと変換し、続く *m*CPBA を用いた酸化反応を行い、五価リン酸エステルのアリル保護体 **120** を得た。最後に、アセトニトリル中、テトラキストリフェニルホスフィンとピロリジンを用いて、全てのアリル基の脱保護を同時に行うことで目的とするリン酸エステル体 **33-P** を得た。なお、本反応は第 4 章、Scheme 4-4 で紹介した化学的なリン酸エステル体合成法に若干の改良を加えている。改良点の一つは、アミノ基の保護基を Alloc 基にすることで、その脱保護反応をリン酸エステル水酸基上の Alloc 基の脱保護と同時に行うことが可能となった点である。もう一点は、リンを三価から五価にするための酸化剤を *tert*-BOOH から *m*CPBA へと変更することで若干の収率向上を達成した点である。

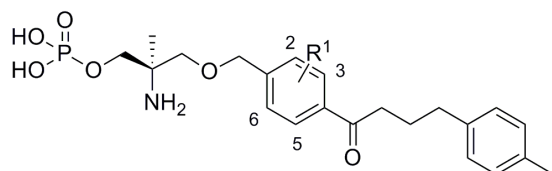


Scheme 5-9. Reagents and conditions: (a) AllocCl, KHCO_3 , AcOEt, H_2O ; (b) $(\text{AllylO})_2\text{PN}(i\text{-Pr})_2$, tetrazole; (c) *m*CPBA, CH_2Cl_2 , 45-88% (3 steps); (d) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, pyrrolidine, CH_3CN , 40-73%.

第 5 節 構造活性相関 (SAR) 研究

まず、中心ベンゼン環状の置換基が S1P 受容体アゴニスト活性に及ぼす効果について検討した。その結果を Table 5-3 に示す。

Table 5-3. The SAR information about the substitution of the central benzene ring.



Entry	Compound	R ¹	EC ₅₀ (nM) ^a		Selectivity (S1P ₃ /S1P ₁)
			S1P ₁	S1P ₃	
1	6-P		7.0	2.0	0.29
2	33a-P	H	7.0	200	29
3	33b-P	2-Me	3.0	180	60
4	33c-P	3-Me	19.0	>20000	>1052
5	33d-P	2-F	2.8	60	21
6	33e-P	2-Cl	4.0	220	55
7	33f-P	2-Et	2.3	12000	5217
8	33g-P	2,6-Me ₂	2.2	340	155
9	33h-P	2,5-Me ₂	6.5	>20000	>3077

^a EC₅₀ is defined as the midpoint between the binding or inhibitory ratio of the vehicle and the maximum response of the test compound.

検討の結果、中心ベンゼン環上の置換基は、その導入箇所や大きさにより S1P₁、S1P₃ アゴニスト両活性値に大きく影響を及ぼすことが判明した。すなわち、単純な置換基としてメチル基を中心ベンゼン環上に導入したところ、アミノアルコール側に対し 2 位の位置にメチル基を導入した **33b-P** では、無置換体 **33a-P** と比較して、S1P₁ 活性は若干向上しつつ、S1P₃ 活性の変化は軽微であった (Entry 3)。一方で、3 位にメチル基を導入した **33c-P** では S1P₁、S1P₃ 両活性共に減弱する結果となった (Entry 4)。

続いて、S1P₁ 活性向上に効果があった 2 位の置換位置に注目し、2 位の位置にメチル基以外の置換基導入を行い、その S1P 受容体活性への影響を調べた。その結果、検討を行った全ての 2 位置換化合物でメチル基と同様に S1P₁ 活性が向上することが確認された (Entry 5-7)。一方、S1P₃ 活性は置換基の種類によって大きく影響を受

けることが判明した。すなわち、比較的小さな置換基群であるフルオロ基を有する **33d-P** などでは、 $S1P_3$ 活性に若干の向上傾向が見られたが (Entry 5)、より大きな置換基のエチル基を導入した **33f-P** では、 $S1P_3$ 活性が大幅に減弱し、その EC_{50} 値は 12000 nM であった (Entry 7)。このように、2 位に置換基を導入することで、強力な $S1P_1$ 活性を維持しつつ、高い $S1P_3/S1P_1$ 選択性 ($S1P_3/S1P_1 = 5217$) を持つ **33f-P** を獲得することに成功した。

次に、二置換体について検討を行った。3 位の置換基導入により $S1P_3$ 活性が減弱するという結果 (Entry 4) を基に 2,5-ジメチル体をデザインしたところ、良好な結果を得ることに成功した。すなわち、2,5-ジメチル体 **33h-P** は $S1P_1$ 活性を維持しつつ、 $S1P_3$ 活性が減弱しており、 $S1P_3/S1P_1$ 選択性が 3077 倍以上に広がった化合物であることが判明した (Entry 8)。一方、2,6-ジメチル体 **33g-P** は、6 位に導入したメチル基の効果は少なく、2 位モノメチル体である **33a-P** とほぼ同等の結果であった (Entry 9)。

このように、中心ベンゼン環への置換基導入を行った結果、高い $S1P_1$ 活性を持ちつつ、 $S1P_3/S1P_1$ 選択性が大きく向上した有望化合物として、2-エチル体 **33f** と、2,5-ジメチル体 **33h** を獲得することに成功した。

続いて、中心ベンゼン環の 2 位置換基として導入したエチル基が、 $S1P$ 受容体のアゴニスト活性に影響を与えた実験結果について、近年報告されている $S1P_1$ の X 線結晶構造解析⁸⁶⁾ と、それを基にして作成した $S1P_3$ のホモロジーモデルを用いて検証した。Figure 5-5 には、エチル体 **33f-P** と $S1P_1$ と $S1P_3$ の induced fit docking モデルを示しており、Figure 5-6 には **33f-P** と $S1P_1$ の induced fit docking モデルについて、周辺アミノ酸残基により作られる疎水性ポケットを組み合わせた図を示している。なお、Figure 5-5 において、水色で示した Leu276 と Val194 は $S1P_1$ モデル、オレンジ色で示した Phe263 と Ile194 は $S1P_3$ モデルにおける化合物周辺のアミノ酸残基を示しており、図を見易くする目的で水素原子の表記は省略している。

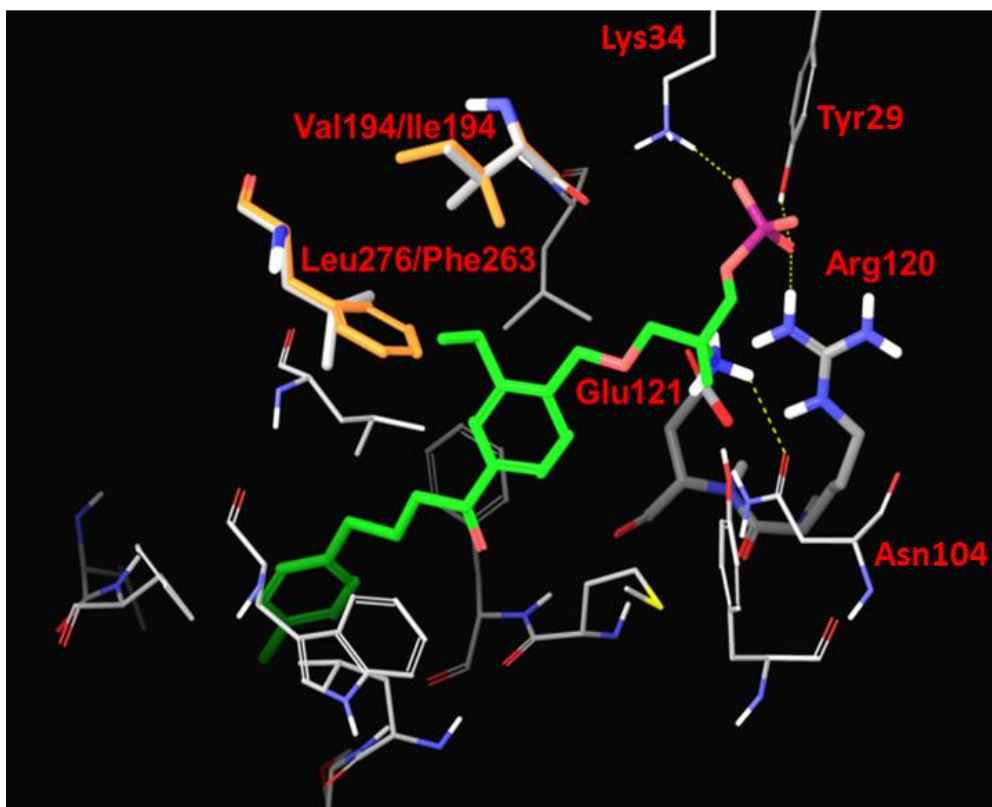


Figure 5-5. The docking model of compound 33f-P into the S1P₁ and S1P₃ model.

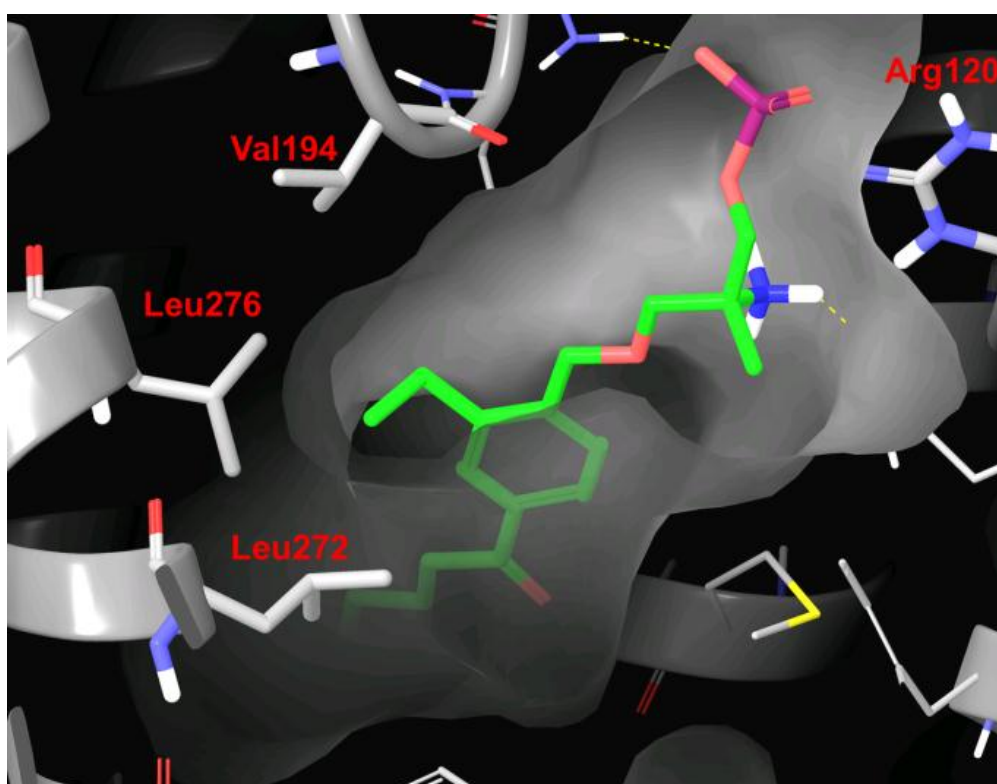


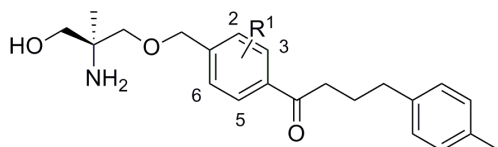
Figure 5-6. Hydrophobic pocket in the docking model of compound 33f-P in the S1P₁ model.

33f-P と **S1P₁** の induced fit docking モデルを用いた計算の結果、Figure 5-5 に示したように、**33f-P** のリン酸エステル上の水酸基は Tyr29、Lys34、Arg120 との水素結合をしており、**33f-P** のアミノ基は Asn104 との水素結合に加え、Glu121 との強い静電相互作用をしていることが認められた。以前報告されている bovine rhodopsin を用いた **S1P₁** との X-線結晶構造解析では、水酸基、アミノ基を認識しているアミノ酸のうち、Arg120 と Glu121 が **S1P** の認識に寄与していることが確認されており、^{87a)} この結果は、今回私が作成したモデルの結果と同じものであった。また、**33f-P** において 2 位に存在するエチル基は **S1P₃** モデルにおける Phe263 (オレンジ色) と大きく干渉する一方、**S1P₁** モデルにおける Leu276 (水色) とは干渉していないことが判明した。さらに、Figure 5-6 に示すように、**S1P₁** モデルにおいて、ベンゼン環上 2 位に存在するエチル基は Val194、Leu276、Leu272 から作られる疎水性ポケットにきれいに格納されていることが明らかとなった。上記解析結果は、エチル基が導入された **33f-P** において、**S1P₃** 活性が減少すると同時に、**S1P₁** 活性が向上したことを合理的に説明し得るものであった。なお、今回行った **S1P₁** と **S1P₃** モデルにおける Phe263 と Leu276 による **S1P₃/S1P₁** 選択性についての考察は、他のグループによっても同様の検討が行われている。^{87b,c)}

また、末端ベンゼン環上の置換基効果についても中心ベンゼン環上の置換基と同様の検討を行ったが、良好な結果は得られなかった。そのため、中心ベンゼン環上から伸びる側鎖としては、4-メチルフェニル基をその末端に持つアルキル鎖を採用し、その後の *in vivo* 評価を行った。

In vivo 評価を行うにあたり、そのリン酸エステル体が良好な *in vitro* プロファイルを示した **33f**、**33h** に加え、**33a**、**33b**、**33e** の計 5 化合物を選抜し、ラットを用いて臓器移植モデルの 1 つである HvGR 試験を実施した。薬効強度は ID₅₀ 値として算出し、その結果を Table 5-4 に示している。なお、薬効が弱く ID₅₀ 値の算出が困難であった化合物については、ID₅₀ 値の代わりに 1 mg/kg 投与時における抑制率を示している。

Table 5-4. *In vivo* efficacy (Rat HvGR) of selected compounds.



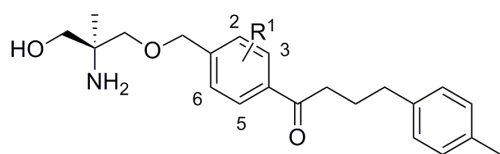
Entry	Compound	R ¹	Rat HvGR
			ID ₅₀ (mg/kg) ^a or % inhibition at 1 mg/kg
1	6 (fingolimod)		0.33
2	33a	H	0.27
3	33b	2-Me	0.43
4	33e	2-Cl	0.39
5	33f	2-Et	10
6	33h	2,5-Me ₂	11

^a ID₅₀ is defined as the midpoint between the inhibitory ratio of the vehicle and the maximum response of the test compound.

Table 5-4 に示したように、**33a**、**33b**、**33e** が非常に強力なラット HvGR 活性を示す一方で、高い S1P₃/S1P₁ 選択性を示した **33f** と **33h** は共に同試験において非常に弱い活性であり、その活性値はコントロール群と比較し、それぞれ 10%、11%の抑制率にとどまった。試験を実施した 5 化合物はいずれも同程度の S1P₁ 活性を有していることから、*in vivo* 活性の差異は各化合物の血中濃度が影響していると考えられた。実際の血中濃度測定に先立ち、今後の化合物選定を効率的に行うためのスクリーニング方法確立を目的として、化合物の全血中におけるリン酸エステル化効率を測定することにした。すなわち、これまで述べてきたように S1P₁ アゴニスト作用を発現する活性本体は、血液中で変換されたリン酸エステル体であることから、化合物のリン酸エステル体への変換効率は、血中でのリン酸エステル体の濃度に影響を与え、しいては *in vivo* 活性発現の重要なファクターになることが考えられた。

各化合物のリン酸エステル化効率の測定結果を Table 5-5 に示した。なお、リン酸エステル化効率は、ラット血液中に各化合物を加え、3 時間後のリン酸エステル体への変換率を測定することにより決定している。

Table 5-5. The ratio of phosphate in plasma of selected compounds.



Entry	Compound	R ¹	Phosphate in Plasma (%) ^a
1	6 (fingolimod)		N.T. ^b
2	33a	H	40
3	33b	2-Me	38
4	33e	2-Cl	84
5	33f	2-Et	14
6	33h	2,5-Me ₂	6.0

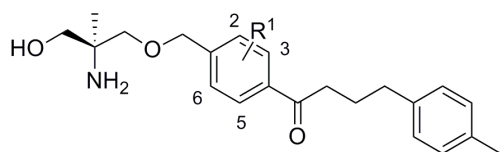
^a The ratio of phosphate was determined by the ratio of the HPLC peak area of the phosphorylated and the remaining test compound in plasma 3 hours after the addition of a test compound to rat whole blood.

^b N.T. = not tested.

33a、**33b**、**33e** はそれぞれ 40%、84%、38%と高い変換率を示したのに対し、*in vivo* 薬効が弱い **33f** と **33h** の両化合物はそれぞれ 14%、6.0%と低い変換率であった。すなわち、エーテル体 **33** の中心ベンゼン環上に存在する置換基の大きさが血中で働く酵素のリン酸エステル化能に大きく影響を与え、その結果、**33f** や **33h** など、比較的大きな置換基を持つ化合物のリン酸エステル化効率が低くなり、弱い *in vivo* 薬効にとどまったと推察された。

33f と **33h** の両化合物は *in vitro* 面では S1P₃/S1P₁ 選択性が高く有望な化合物であったが、残念ながら *in vivo* 薬効を示さないという結果を受け、次に、強力な *in vivo* 薬効を示した **33b** と **33e** に着目することとした。これらの化合物は HvGR 試験において強力な *in vivo* 薬効を持つ (Table 5-4: Entry 3, 4) 一方で、S1P₃/S1P₁ 選択性はそれぞれ 60 倍、55 倍 (Table 5-3: Entry 3, 6) であり、**33f** や **33h** の S1P₃/S1P₁ 選択性に比べると見劣りする化合物であった。しかしながら、fingolimod で問題となっている毒性 (一過性の序脈) の懸念を払拭できれば、**33b** や **33e** など十分有望な化合物になり得ると考えられた。そこで、これら 2 化合物 (**33b**、**33e**) の安全性面での評価を行うため、ラットに化合物 30 mg/kg を経口投与した時の心拍数への影響について、fingolimod **6** との比較試験を実施した。その結果を Table 5-6 に示す。なお、Table 5-6 に記載した心拍数減少値は化合物投与後 24 時間の間における心拍数の最大値 (または最小値) をコントロール値からの変化量 (割合) で表しており、その値を徐脈のポテンシャルとして評価している。

Table 5-6. The heart rate change of selected compounds.



Entry	Compound	R ¹	Heart rate decrease (%) ^a
1	6 (fingolimod)		24 ^b
2	33a	H	N.T. ^c
3	33b	2-Me	-4.4
4	33e	2-Cl	4.0
5	33f	2-Et	N.T. ^c
6	33h	2,5-Me ₂	N.T. ^c

^a Each value shows the percentage of the maximum heart rate decrementation that occurred during 48 hours after 30 mg/kg oral administration in rats in comparison to the vehicle treated control group.

^b p.o., 10 mg/kg.

^c N.T. = not tested.

報告されている通り fingolimod **6** は強い徐脈作用を持ち、10 mg/kg 投与時の心拍数減少率は 24%であった。一方、**33b** と **33e** は 30 mg/kg 投与群においても心拍数の最大変化率はそれぞれ 4.4%増加、4.0%減少と非常に軽微であった。**33b**、**33e** のラット HvGR 試験の ID₅₀ 値は fingolimod **6** とほぼ同等であることに加え、ラットにおける各化合物の 1 mg/kg から 30 mg/kg までの経口投与時の血中暴露には線形性がみられることを考慮すると、**33b**、**33e** は、その徐脈リスクにおいて、fingolimod より高い安全性を持つ化合物であると言えた。

最後に、fingolimod **6** と今回デザインしたエーテル体 (**33a**、**33b**、**33e**) に加え、そのリン酸エステル体 (**6-P**、**33a-P**、**33b-P**、**33e-P**) の PK プロファイルを測定した。Table 5-7 には、親化合物であるアミノアルコール体をラットに 1 mg/kg 経口投与した時の測定結果を示している。

Table 5-7. The PK profiles of benzyl ether compounds in rats^a

Entry	Compound	Cmax (ng/ml)	AUC ₀₋₄₈ (ng*hr/ml)	T _{1/2} (h)	Metabolic stability (%) ^b
1	6	N.D. ^c	N.D. ^c	N.D. ^c	97
2	6-P	111	5850	32	>100
3	33a	13	120	5.7	51
4	33a-P	72	799	7.8	92
5	33b	34	200	4.1	36
6	33b-P	104	806	4.3	92
7	33e	18	144	4.6	38
8	33e-P	97	658	4.6	86

^a Each parameter was determined after oral dosing of each parental compound. (1.0 mg/kg, n = 2 or 3).

^b Percentage of the remaining compounds after 30 min incubation at 37°C with rat hepatic microsomes.

^c N.D. = no data.

すべての親化合物 (**33a**、**33b**、**33e**) の血漿中濃度は、対応するリン酸エステル体 (**33a-P**、**33b-P**、**33e-P**) より低く、また、血中半減期については、両化合物間ではほぼ同じ値であった。特に、**33b-P** と **33e-P** の血中半減期は、期待通り、fingolimod のリン酸エステル体 **6-P** と比較して大幅に短縮されており、各々4.3時間、4.6時間であった。この短半減期傾向は、各親化合物の代謝安定性によって説明することができた。すなわち、fingolimod **6** はラット肝ミクロソームに対して非常に高い代謝安定性を示し、化合物残存率は97%であったのに対し、**33b**、**33e** はそれぞれ36%、38%という低い値であり、それにより血中で存在するリン酸エステル体の半減期が短くなっていると言えた。

第6節 結語

Fingolimod が有する S1P₃/S1P₁ 選択性の低さと、その活性本体であるリン酸エステル体の血中半減期の長さに注目し、それらを改善する目的で fingolimod **6** の構造を基に、リンカー部位にエーテル結合を有する **33** を基本テンプレートとしてデザインし、その SAR 研究を行った。その結果、無置換ベンゼン体 **33a** は予想通り短半減期傾向を示し、さらに fingolimod と比較して、良好な S1P₃/S1P₁ 選択性と強力な *in vivo* 薬効を有しており、エーテル体 **33** が高いポテンシャルを持つことが明らかとなった。また、**33** における中心ベンゼン環上の置換基が S1P₃/S1P₁ 選択性に大きく影響を与えることを明らかとした。特に、2-エチル体 **33f** や、2,5-ジメチル体 **33h** は

S1P₁ アゴニスト活性を維持したまま、S1P₃ アゴニスト活性が大きく低減し、それぞれ 5217 倍、3000 倍の S1P₃/S1P₁ 選択性を持つ優れた化合物であった。なお、上記結果は、S1P₁ および S1P₃ と **33f-P** を用いた計算化学的解析からも支持されるものであった。さらに、化合物の *in vivo* 薬効は、そのリン酸エステル化効率と相関していることを明らかとした。すなわち、S1P₃/S1P₁ 選択性の高い **33f** や **33h** は、そのリン酸エステル体への変換効率の低さから、非常に弱い *in vivo* 薬効にとどまったのに対し、**33a** を含めた **33b** や **33e** などの化合物は高いリン酸エステル変換率を持ち、その結果、強力な *in vivo* 薬効を発現し得ることが明らかとなった。このリン酸エステル変換率測定法の確立は、化合物のリン酸エステル化効率が *in vivo* 薬効発現の重要なファクターの一つであることを証明しただけでなく、その方法をスクリーニング段階に採用することによって、効率的な化合物選定にも貢献するものであった。各種検討の結果、強力な *in vivo* 薬効を示し、当初目的としていた適度に短い半減期に加え、徐脈リスクが少なく、高い安全性を持つ有望な化合物として **33b** や **33e** を獲得することに成功した。

第 6 章 結論

田辺三菱製薬、Novartis により多発性硬化症治療薬として上市されている fingolimod **6** が持つ、副作用としての催徐脈作用や、臨床現場では扱い難いと思われる非常に長い半減期を改善すべく、fingolimod **6** の構造を基にした創薬研究に着手した。まず、fingolimod **6** が持つ α,α -二置換、 α -アミノアルコール構造は重要な pharmacophore であることを考慮し、Figure 6-1 に示す二つの化合物 (**14**、**15**) をデザインし、各種合成法検討、構造活性相関研究を実施した。

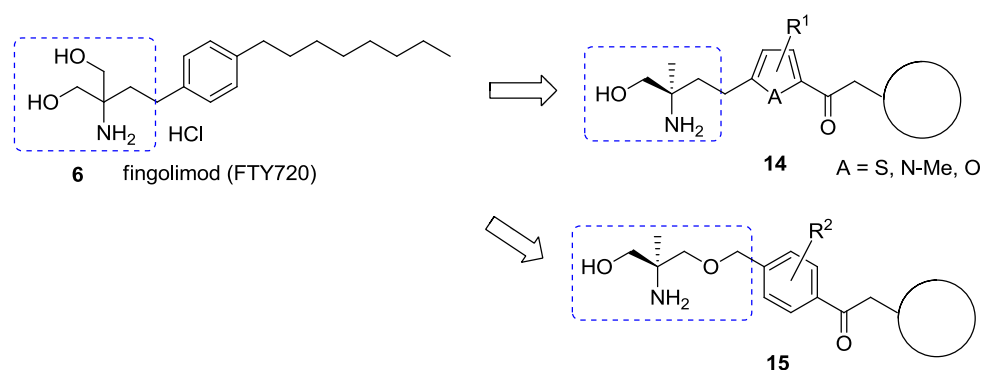


Figure 6-1. Structural modification of fingolimod **6**.

第 2 章では、一般式 **14** で示す化合物合成に必要な (2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造 (青点線枠) を有する各種ヘテロ環合成中間体 **16** について、リパーゼを用いた不斉非対称化(モノエステル化)反応を用いた構築法検討を実施した。2-*tert*-ブトキシカルボニルアミノ-2-メチル-1,3-プロパンジオール **18** が有する対称性に注目し、**18** に対する各種リパーゼの不斉非対称化能について検討した結果、高収率、高選択的にモノエステル化を進行させるリパーゼと、最適な反応条件を見出し、光学活性な(2*R*)-アミノ-2-メチル-1-プロパノール構造の構築に成功した。本反応は、安価な化合物を出発原料にできることに加え、用いる酵素を変えることにより、同一原料から両立体の光学活性化合物 ((*R*)-**17a**、(*S*)-**44**) をそれぞれ約 90% の鏡像体過剰率で作り分けることが可能な優れた反応であった。さらに、本反応により得られた光学活性アルコール体を出発原料とすることで、後の 5 章にて紹介する一般式 **15** で示す化合物群を含む S1P₁ アゴニストの中間体に加え、 α -置換アラニン誘導体の合成素子として利用可能な **19** を短工程で創製することが可能であった。また、本酵素反応はキログラムスケールでの実施も可能であり、汎用性、実用性の両面で優れた反応であった。

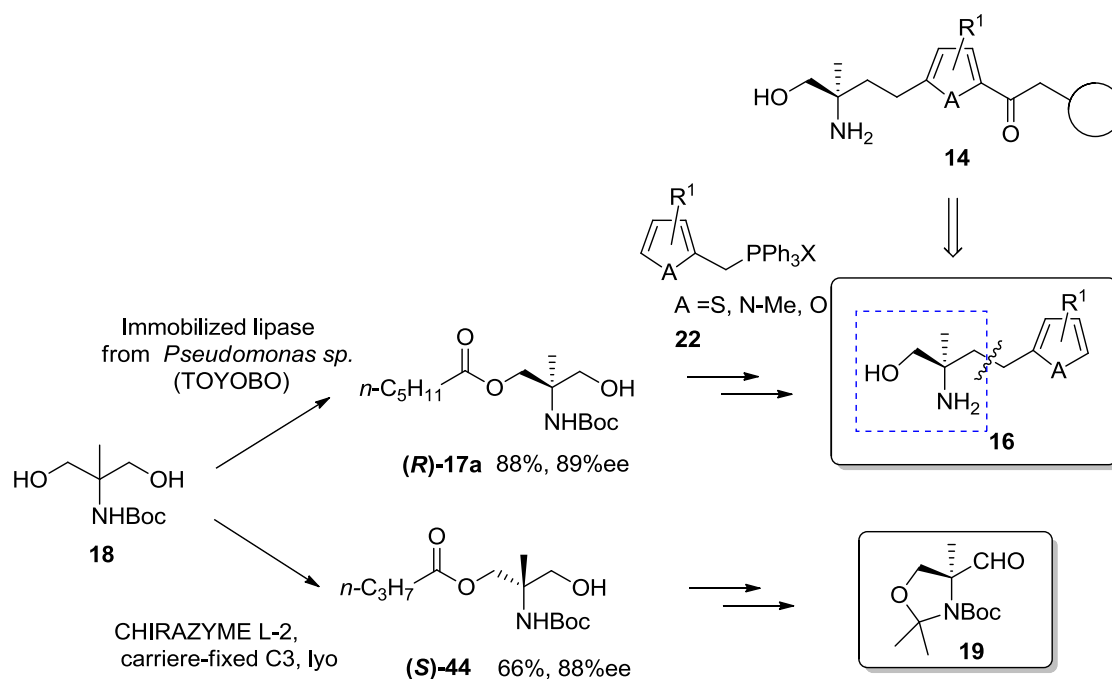


Figure 6-2. Summary of Chapter 2.

第3章では、従来の中間体合成法における問題点解消のため、ホスホニウム塩 **24b** の合成と、そのホスホニウム塩を用いた中間体 **20** (or **30**) 合成について検討した。ホスホニウム塩 **24b** は、その調製自体に数工程を要する点や、各種アルデヒド **25** との Wittig 反応では、収率向上のために過剰量必要になるなどのデメリットはあるものの、芳香族、脂肪族問わず様々なアルデヒドと反応し、中～高収率でオレフィン体を与える優れた反応剤であった。特に、ホスホニウム塩 **24b** は、立体障害が大きい芳香族アルデヒドや、対応するアルキルハライドの調製が困難である電子豊富な芳香族アルデヒドとも問題なく反応するものであり、私が行う S1P₁ アゴニスト研究において合成の効率化に寄与する優れた反応剤であった。さらに、ホスホニウム塩 **24b** は、調製が容易なアルデヒドを反応相手とする convergent な反応により各種生理活性物質の合成を可能にするものであり、S1P₁ アゴニスト化合物 (**28**, **29**) や TAAR1 アゴニスト化合物 **31** 合成にも適用可能であった。また、ホスホニウム塩 **24b** と各種芳香族アルデヒドとの反応では、ジアステレオ選択的に *E* 体のみが生成物として得られてくることが判明した。ジアステレオ選択的なオレフィン体は、続く立体選択的な官能基導入を可能にすることから、ホスホニウム塩 **24b** は α, α -二置換 α -アミノ酸構造を有する多様な天然物合成にも応用され得る反応剤であると言えた。

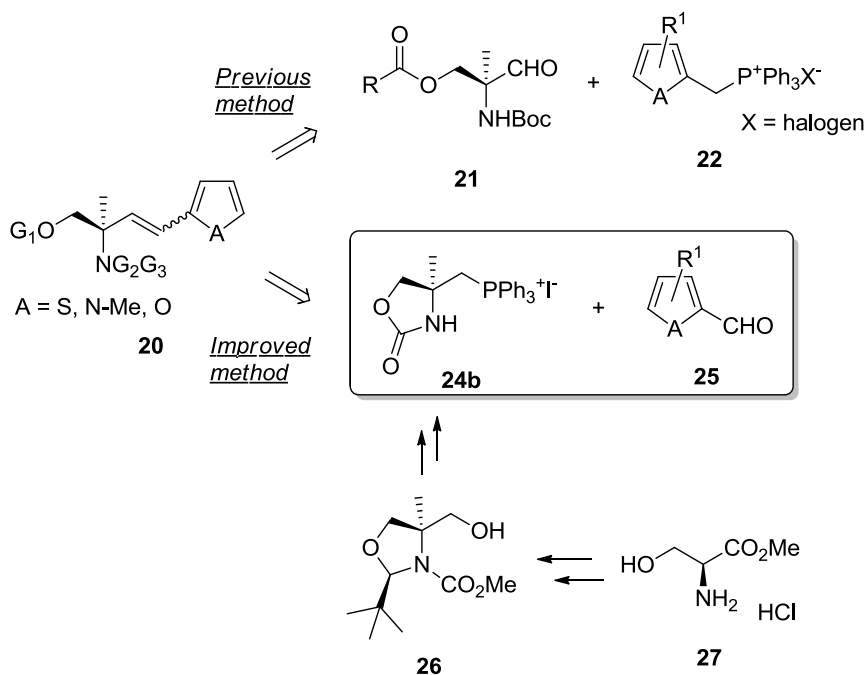


Figure 6-3. Summary of Chapter 3 (part 1).

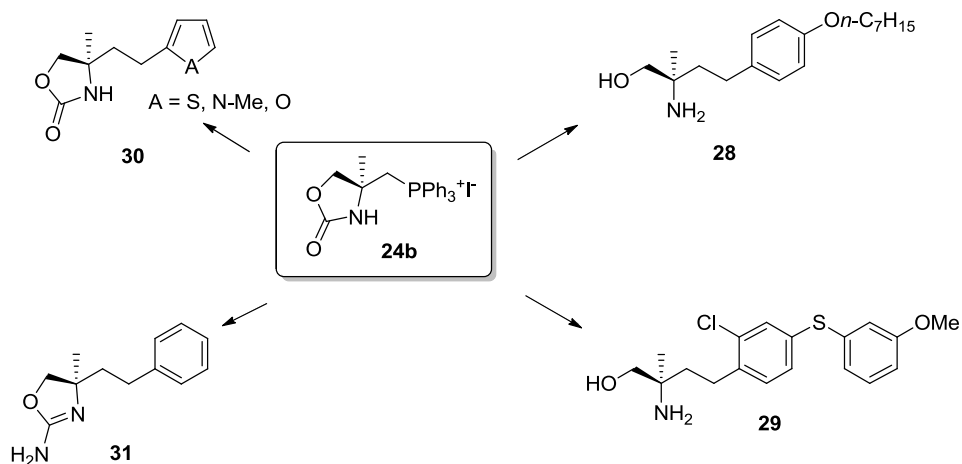


Figure 6-3. Summary of Chapter 3 (part 2).

第 4 章では、S1P₁ アゴニストの親化合物であるアミノアルコール体 **32** から活性本体であるリン酸エステル体 **32-P** を合成する方法として、微生物を用いた合成法検討を行った。その結果、所有する独自の微生物ライブラリーの中から、目的とするリン酸エステル化反応を効率的に行う微生物として糸状菌の一種である *Circinella* 属を見出し、中でも、*Circinella muscae* (NBRC 4457) に非常に高いリン酸化効率を見出すことに成功した。また、本微生物変換反応では、反応溶液の pH や反応温度

の調節に加え、凍結乾燥菌体の使用等の改良を加えることにより、その反応性、収率を飛躍的に向上させることが可能であった。こうして得られた最適反応条件は、様々なアミノアルコール体のリン酸エステル化反応に適用でき、さらに、質量分析計と連動させた自動精製システムを組み合わせることにより、高純度のリン酸エステル体を簡便に合成することが可能となった。これにより、当初目的としていた多検体スクリーニング用のリン酸エステル体合成法を構築することに成功した。今回確立した微生物変換反応は、保護、脱保護を要せず、1工程で目的とするリン酸エステル体を与える手法であり、反応の効率化の点に加え、グリーンケミストリーの観点でも優れた手法であった。

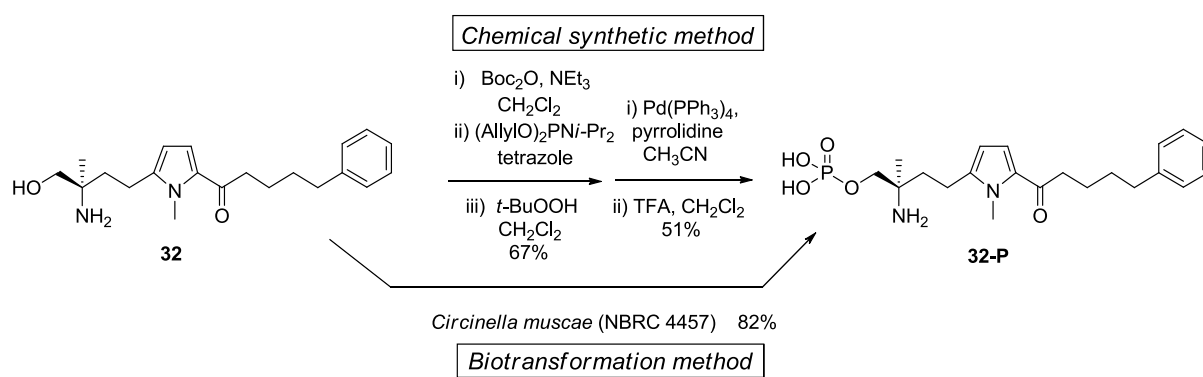
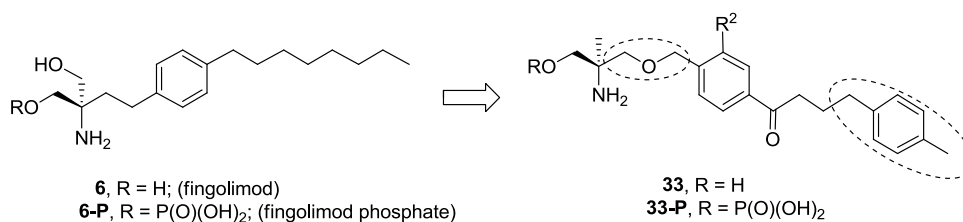


Figure 6-4. Summary of Chapter 4.

第5章では、fingolimodが有する $\text{S1P}_3/\text{S1P}_1$ 選択性の低さと、その活性本体であるリン酸体の半減期の長さ注目し、それらを改善する化合物としてfingolimod **6**の構造を基にリンカー部位にエーテル結合を有する**33**について探索研究を行った。その結果、**33**は短半減期傾向に加え、fingolimodと比較して、良好な $\text{S1P}_3/\text{S1P}_1$ 選択性と強力な*in vivo*薬効を持つ、ポテンシャルの高い化合物であることが判明した。その後のSAR研究の結果、中心ベンゼン環上の置換基が $\text{S1P}_3/\text{S1P}_1$ 選択性に大きく影響を与えることを明らかとした。特に、2-エチル体**33f**や、2,5-ジメチル体**33h**などは S1P_1 アゴニスト活性を維持したまま、 S1P_3 アゴニスト活性が大きく低減させ、各々5217倍、3000倍の $\text{S1P}_3/\text{S1P}_1$ 選択性を持つ化合物であった。なお、上記結果は、 S1P_1 および S1P_3 と**33f-P**を用いた計算化学的解析からも支持されるものであった。さらに、化合物の*in vivo*薬効は、そのリン酸エステル化効率と相関していることを明らかとした。すなわち、選択性が高かった**33f**、**33h**は、そのリン酸エステル体への変換効率の低さから、非常に弱い*in vivo*薬効にとどまったのに対し、**33a**を含めた**33b**や**33e**などは高いリン酸エステル変換率から、強力な*in vivo*薬効を発現することが判明した。また、化合物のリン酸エステル変換率測定法の確立に

より、その変換率が *in vivo* 薬効発現の重要なファクターの一つであることを証明できただけでなく、その方法をスクリーニング段階に採用することによって、効率的な化合物選定を達成した。各種検討の結果、強力な *in vivo* 薬効を示し、当初目的としていた適度に短い半減期に加え、徐脈リスクが少なく、高い安全性を持つ有望な化合物として **33b** や **33e** を獲得することに成功した。

Table 6-1. Summary of Chapter 5.



Comp	R ²	EC ₅₀ (nM)		S1P ₃ / S1P ₁	Rat HvGR		Phosphate in Plasma (%) ^b	Heart rate decrease (%) ^d	T _{1/2} (h)
		S1P ₁	S1P ₃		ID ₅₀ (mg/kg) ^a or % inhibition				
6 (fingolimod)		7.0	2.0	0.29	0.33		N.T. ^c	24 ^e	32
33a	H	7.0	200	29	0.27		40	N.T. ^c	7.8
33b	Me	3.0	180	60	0.43		38	-4.4	4.3
33e	Cl	4.0	220	55	0.39		84	4.0	4.6
33f	Et	2.3	12000	5217	10 (1 mg/kg)		14	N.T. ^c	N.T. ^c
33h	2,5- Me ₂	6.5	>20000	>3077	11 (1 mg/kg)		6.0	N.T. ^c	N.T. ^c

^a ID₅₀ is defined as the midpoint between the inhibitory ratio of the vehicle and the maximum response of the test compound.

^b The ratio of phosphate was determined by the ratio of the HPLC peak area of the phosphorylated and the remaining test compound in plasma 3 hours after the addition of a test compound to rat whole blood.

^c N.T. = not tested.

^d Each value shows the percentage of the maximum heart rate decrementation that occurred during 48 hours after 30 mg/kg oral administration in rats in comparison to the vehicle treated control group.

^e p.o., 10 mg/kg.

実験の部

本研究では、化合物の分析に以下の機器を用いた。

¹H NMR スペクトル (¹H NMR)

Unity Mercury Plus 400 or 500 spectrometer (Varian)

化学シフト値は ppm 単位で記載し、内部標準として、tetramethylsilane (TMS) を使用した。また形状の標記には以下の略語を用いた。

s, singlet; brs, broad singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; m, mutiplet.

旋光度測定 ([α])

JASCO P-1030, HORIBA SEPA-300 digital polarimeter または Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.において実施

赤外吸収スペクトル (IR)

JASCO FT/IR-610 spectrophotometer または Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.において実施

質量分析スペクトル または 高分解能質量分析スペクトル (MS or HRMS)

JEOL GCmate, JEOL JMS-AX505H または Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.において実施

元素分析 (Anal)

Yanaco MT-5, MT-6 または Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.において実施

融点 (mp)

Yanaco MP-500D または Daiichi Sankyo RD Novare Co., Ltd.において実施

薄層クロマトグラフィー (TLC)

Merck precoated TLC glass sheets with gel 60F₂₅₄

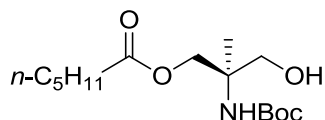
シリカゲルクロマトグラフィー

Silica gel 60 (Merck, 230-400 mesh ASTM), Biotage FLASH Si, YAMAZEN Hi-Flash
または Moritex Purif-Pack

第 2 章に関する実験

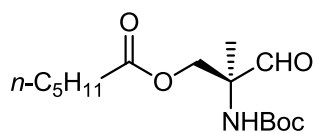
(2R)-tert-Butoxycarbonylamino-3-hexanoyloxy-2-methyl-1-propanol ((R)-17a)

: a general procedure of an asymmetric reaction with Lipase catalysts.



2-tert-Butoxycarbonylamino-2-methyl-1,3-propanediol **18** (150 g, 731 mmol)をジイソプロピルエーテル(3.00 l)に懸濁し、vinyl *n*-hexanoate (120 ml, 751 mmol)及びリパーゼ [Immobilized lipase from *Pseudomonas* sp. (TOYOBO, 0.67 U/mg)] (6.00 g)を加え、室温で 1.5 時間攪拌した。反応液をろ過後、ろ液を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 10:1 to 2:1)により精製して、標記化合物(**R**)-**17a** (197 g, 89.0% yield, 89.0% ee)を無色油状物質として得た。なお、得られた(**R**)-**17a**の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OF (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 70:30, 流速: 0.50 ml/min, 温度: 25.0°C. 保持時間は(**S**)-**17a**と(**R**)-**17a**はそれぞれ 8.2 分と 10.5 分であった。 $[\alpha]_D^{20} = -8.8$ (*c* 1.8, CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz), 1.25 (s, 3H), 1.30-1.40 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.58-1.68 (m, 2H), 2.36 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.70-3.55 (m, 2H), 3.86 (br s, 1H), 4.19 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 4.25 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 4.86 (s, 1H); IR (KBr) 3415, 3380, 2961, 2935, 2874, 1721, 1505, 1458, 1392, 1368, 1293, 1248, 1168, 1076 cm⁻¹; MS (FAB) *m/z*: 304 (M+H)⁺.

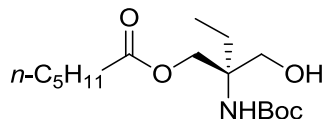
(2S)-tert-Butoxycarbonylamino-3-hexanoyloxy-2-methyl-1-propanal (40a)



(2R)-tert-Butoxycarbonylamino-3-hexanoyloxy-2-methyl-1-propanol (**R**)-**17a** (30.7 g, 100 mmol)を CH₂Cl (600 ml)に溶解し、モレキュラーシーブ 4 Å (220 g)および pyridinium chlorochromate(43.6 g, 200 mmol)を氷冷下に加え、室温で 2 時間攪拌した。反応液に Et₂O (500 ml)を加え、析出した不溶物をろ過した。ろ液を減圧下留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 10:1 to 5:1)により精製して、標記化合物 **40a** (28.8 g, 95.0%)を無色油状物質として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz), 1.40-1.25 (m, 4H), 1.38 (s, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.70-1.55 (m, 2H), 2.32 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 4.32 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 4.44 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 5.26 (brs, 1H), 9.45 (s, 1H); IR (liquid film) 3367, 2961, 2935, 2874, 1742, 1707, 1509, 1458,

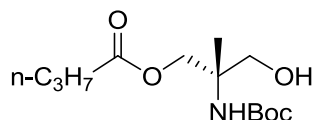
1392, 1369, 1290, 1274, 1254, 1166, 1100, 1078 cm^{-1} ; MS (FAB) m/z : 302 (M+H)⁺.

(2R)-tert-Butoxycarbonylamino-2-ethyl-3-hexanoyloxy-1-propanol ((R)-43)



2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-ethyl-1,3-propanediol **42** (52.9 g, 241 mmol)をジイソプロピルエーテル(1.00 l)に懸濁し、vinyl *n*-hexanoate (41.0 ml, 254 mmol)及びリパーゼ [Immobilized lipase from *Pseudomonas* sp. (TOYOBO, 0.670 U/mg)] (2.10 g)を加え、室温で4時間攪拌した。反応液をろ過後、ろ液を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 7:1 to 2:1)により精製して、標記化合物(**R**)-**43** (66.8 g, 87.0% yield, 93.0% ee)を無色油状物質として得た。なお、得られた(**R**)-**43**の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OF (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 80:20, 流速: 0.50 ml/min, 温度: 25.0°C. 保持時間は(**S**)-**43**と(**R**)-**43**はそれぞれ7.4分と7.9分であった。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.87-0.83 (m, 6H), 1.30-1.25 (m, 4H), 1.44 (s, 9H), 1.63-1.53 (m, 4H), 1.78-1.69 (m, 1H), 2.35 (t, 2H, *J* = 7.7 Hz), 3.65-3.62 (m, 2H), 4.10 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz), 4.24 (d, 1H, *J* = 11.0 Hz), 4.76 (br s, 1H); MS (FAB) m/z : 318 (M+H)⁺.

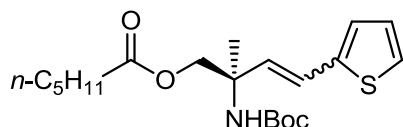
(2S)-tert-Butoxycarbonylamino-3-butanoyloxy-2-methyl-1-propanol ((S)-44)



2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-1,3-propanediol **18** (22.2 g, 107 mmol)を*tert*-butylmethylether (550 ml)に懸濁し、vinyl *n*-butanoate (40.8 ml, 322 mmol)及びリパーゼ [CHIRAZYME L-2,carrier-fixed C3, Iyo] (5.40 g)を加え、室温で1.5時間攪拌した。反応液をろ過後、ろ液を減圧下留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 10:1 to 2:1)により精製して、標記化合物(**S**)-**44** (19.4 g, 66.0% yield, 89.0% ee)を無色油状物質として得た。なお、得られた(**S**)-**44**の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OF (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 70:30, 流速: 0.50 ml/min, 温度: 25.0°C. 保持時間は(**S**)-**44**と(**R**)-**44**はそれぞれ8.2分と10.5分であった。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.94 (t, 3H, *J* = 11.0 Hz), 1.23 (s, 3H), 1.41 (s, 9H), 1.65 (tq, 2H, *J* = 7.4 Hz, 7.4 Hz), 2.32 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.56 (d, 1H, *J* = 11.7 Hz), 3.62 (d, 2H, *J* = 11.7 Hz), 4.18 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz), 4.22 (d, 1H, *J* = 11.1 Hz), 4.85 (s, 1H); IR (liquid film) 3415, 3380, 2961,

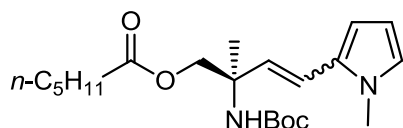
2935, 2874, 1721, 1505, 1458, 1392, 1368, 1293, 1248, 1168, 1076 cm^{-1} ; MS(FAB) m/z : 276 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

(2R)-tert-Butoxycarbonylamino-1-hexanoyloxy-2-methyl-4-(thiophen-2-yl)-3-butene (45a)



(Thiophen-2-yl)methyl triphenylphosphonium bromide **22a** (67.1 g, 150 mmol)を THF (750 ml)に懸濁し、氷冷撹拌下、potassium *tert*-butoxide (17.2 g, 150 mmol)を THF (90.0 ml)に溶解した溶液を 10 分間かけて加え、さらに室温下 20 分間撹拌した。ついで、氷冷下、(2*S*)-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-*n*-hexanoyloxy-2-methyl-1-propanal **40a** (23.0 g, 76.4 mmol)の THF (250 ml)溶液を 15 分間かけて加え、氷冷下 30 分間撹拌した。反応液に水(300 ml)を加え、AcOEt(200 ml x 2)で抽出した。有機層を水(100 ml)および飽和食塩水(200 ml)で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 20:1)により精製して、標記化合物 **45a** (27.8 g, 96.0%)を無色油状物質として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.40-1.25 (m, 7H), 1.57, 1.50, 1.44 (s, total 9H), 1.70-1.55 (m, 2H), 2.34 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 4.40-4.10 (m, 2H), 4.94, 4.93 (brs, total 1H), 5.58 (d, 0.5 H, $J = 13.6$ Hz), 6.10 (d, 0.5 H, $J = 16.0$ Hz), 6.60 (d, 0.5 H, $J = 13.6$ Hz), 6.63 (d, 0.5 H, $J = 16.0$ Hz), 7.04-7.01, 7.01-6.93 (m, total 2H), 7.32-7.26, 7.16-7.14 (m, total 1H); IR (liquid film) 3370, 2961, 2933, 1725, 1495, 1456, 1391, 1367, 1247, 1167, 1109, 1100, 1072, 697 cm^{-1} ; MS (FAB) m/z : 381 (M^+).

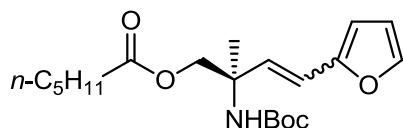
(2R)-2-tert-Butoxycarbonylamino-1-*n*-hexanoyloxy-2-methyl-4-(1-methylpyrrol-2-yl)-3-butene (45b)



(1-Methylpyrrol-2-yl)methyl triphenylphosphonium iodide **22b** (58.0 g, 120 mmol)を THF (300 ml)に懸濁し、氷冷撹拌下、potassium *tert*-butoxide (13.5 g, 120 mmol)を THF (180 ml)に溶解した溶液を 30 分間かけて加え、さらに氷冷下 80 分間撹拌した。ついで、(2*S*)-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-*n*-hexanoyloxy-2-methyl-1-propanal **40a** (30.3 g, 101 mmol)を THF (120 ml)に溶解した溶液を 30 分間かけて加え、氷冷下 30 分間撹拌した。反応液に飽和 NH₄Cl 水溶液(50.0 ml)を加えて反応を止め、液温を室温に戻

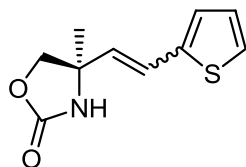
し、減圧下濃縮し、水(100 ml)および AcOEt(100 ml)を加え、AcOEt (100 ml x 2)で抽出した。有機層を水(100 ml)および飽和食塩水(100 ml)で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 9:1)により精製して、標記化合物 **45b** (37.0 g, 97.0%)を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.92-0.87 (s, 3H), 1.67-1.22 (m, 18H), 2.36-2.30 (m, 2H), 3.54 (s, 1.5H), 3.60 (s, 1.5H), 4.34-4.16 (m, 2H), 4.81 (brs, 0.5H), 5.04 (brs, 0.5H), 5.58 (d, 0.5H, *J* = 12.5 Hz), 5.99 (d, 0.5H, *J* = 16.1 Hz), 6.08 (t, 0.5H, *J* = 3.2 Hz), 6.11 (t, 0.5H, *J* = 3.2 Hz), 6.27 (d, 0.5H, *J* = 12.5 Hz), 6.30-6.26 (m, 1H), 6.38 (d, 0.5H, *J* = 16.1 Hz), 6.57 (t, 0.5H, *J* = 2.3 Hz), 6.60 (t, 0.5H, *J* = 2.3 Hz); MS (EI) *m/z*: 280 (M⁺).

(2R)-2-tert-Butoxycarbonylamino-1-hexanoyloxy-2-methyl-4-(furan-2-yl)-3-butene
(45c)



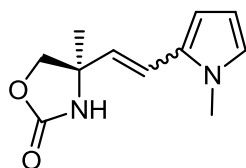
(Furan-2-yl)methyl triphenylphosphonium bromide **22c** (33.7 g, 79.5 mmol)を THF (90.0 ml)に懸濁し、氷冷攪拌下、potassium *tert*-butoxide (8.94 g, 79.7 mmol)を THF (90.0 ml)に溶解した溶液を 10 分間かけて加え、さらに氷冷下 15 分間攪拌した。ついで、(2*S*)-2-*tert*-butoxycarbonylamino-3-*n*-hexanoyloxy-2-methyl-1-propanal **40a** (16.2 g, 53.7 mmol)を THF (60.0 ml)に溶解した溶液を 15 分間かけて加え、氷冷下 30 分間攪拌した。反応液に飽和 NH₄Cl 水溶液(50.0 ml)を加えて反応を止め、液温を室温に戻し、減圧下濃縮し、水(100 ml)および AcOEt(100 ml)を加え、AcOEt (100 ml x 2)で抽出した。有機層を水(100 ml)および飽和食塩水(100 ml)で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 10:1)により精製して、標記化合物 **45c** (19.3 g, 98.0%)を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.92-0.87 (s, total 3H), 1.67-1.22 (m, total 20H), 2.36-2.32 (m, total 2H), 4.18 (d, 0.5H, *J* = 11.0 Hz), 4.25 (d, 0.5H, *J* = 11.0 Hz), 4.32 (d, 0.5H, *J* = 11.0 Hz), 4.43 (d, 0.5H, *J* = 11.0 Hz), 4.82 (brs, 0.5H), 5.22 (brs, 0.5H), 5.59 (d, 0.5H, *J* = 12.7 Hz), 6.20 (d, 0.5H, *J* = 15.9 Hz), 6.26-6.22 (m, total 1H), 6.33 (d, 0.5H, *J* = 15.9 Hz), 6.36-6.35 (m, total 1H), 6.41 (dd, 0.5H, *J* = 2.9, 1.6 Hz), 7.33 (d, 0.5H, *J* = 1.5 Hz), 7.45 (d, 0.5H, *J* = 1.6 Hz); IR (liquid film) 3445, 2962, 2933, 2873, 2250, 1720, 1497, 1457, 1391, 1368, 1249, 1165, 1075, 1015 cm⁻¹; MS (FAB) *m/z*: 366 (M+H)⁺.

(4R)-Methyl-4-[2-(thiophen-2-yl)ethenyl]oxazolidin-2-one (46a)



(2R)-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-*n*-hexanoyloxy-2-methyl-4-(thiophen-2-yl)-3-butene **45a** (40.5 g, 110 mmol)を THF (150 ml)および MeOH (150 ml)の混合液に溶解し、氷冷下、2 規定 NaOH 水溶液(530 ml)を加え、30 分間攪拌後、さらに室温で 1 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣に水(300 ml)を加えた後、CH₂Cl₂ (300 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水(200 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、粗生成物 *tert*-butyl [(2R)-1-hydroxy-2-methyl-4-(thiophen-2-yl)but-3-en-2-yl]carbamate (35.0 g)を得た。粗生成物を THF (300 ml)に溶解し、potassium *tert*-butoxide (17.8 g, 160 mmol)を氷冷下 10 分間かけて加え、その後、室温で 40 分間攪拌した。反応液に水(100 ml)を加え、AcOEt(200 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水(200 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:1 to 1:1)により精製して、標記化合物 **46a** (18.0 g, 81.0%)を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.55 (s, 1.5H), 1.60 (s, 1.5H), 4.31-4.16 (m, 1.5H), 4.41 (d, 0.5H, *J* = 8.6 Hz), 5.65 (d, 0.5H, *J* = 12.5 Hz), 6.06 (d, 0.5H, *J* = 16.0 Hz), 6.17 (brs, 1H), 6.59 (d, 0.5H, *J* = 12.5 Hz), 6.74 (d, 0.5H, *J* = 16.0 Hz), 7.07-6.91 (m, 2H), 7.19 (d, 0.5H, *J* = 5.0 Hz), 7.34 (d, 0.5H, *J* = 5.1 Hz); IR (KBr) 3275, 3110, 2974, 1752, 1391, 1376, 1281, 1169, 1039, 960, 704 cm⁻¹; MS (FAB) *m/z*: 209 (M⁺).

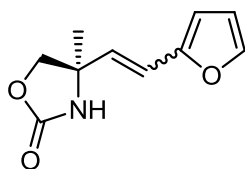
(4R)-Methyl-4-[2-(1-methylpyrrol-2-yl)ethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one (46b)



(2R)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-*n*-hexanoyloxy-2-methyl-4-(1-methylpyrrol-2-yl)-3-butene **45b** (37.0 g, 97.8 mmol)を THF (100 ml)および MeOH (100 ml)の混合液に溶解し、2 規定 NaOH 水溶液(100 ml)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液に水(200 ml)および CH₂Cl₂(100 ml)を加えて、CH₂Cl₂ (100 ml x 2)で抽出し、有機層を飽和食塩水(100 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、粗生成物 *tert*-butyl [(2R)-1-hydroxy-2-methyl-4-(1-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)but-3-en-2-yl]carbamate (28.8 g, 100%)を得た。粗生成物を THF (320 ml)に溶解し、

potassium *tert*-butoxide (13.2 g, 117 mmol)を THF (80.0 ml)に溶解した溶液を氷冷下 10 分間かけて加え、同温度下で 20 分間攪拌した。反応液に acetic acid (6.70 ml, 117 mmol)を加えて中和し、減圧下濃縮して、水(100 ml)および AcOEt(100 ml)を加え、AcOEt(100 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水(100 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 1:1 to 1:2)により精製して、標記化合物 **46b** (20.3 g, 100%)を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.57 (s, 3H), 1.59 (s, 3H), 3.55 (s, 3H), 3.62 (s, 3H), 4.16 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 4.17 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 4.22 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 4.31 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 5.11 (br s, 1H), 5.46 (br s, 1H), 5.65 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz), 5.99 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz), 6.07 (br d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 6.14-6.10 (m, 2H), 6.31 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz), 6.36 (dd, 1H, *J* = 3.7, 1.5 Hz), 6.48 (d, 1H, *J* = 15.7 Hz), 6.62 (t, 1H, *J* = 1.5 Hz), 6.67 (t, 1H, *J* = 2.1 Hz); MS (EI) *m/z*: 206 (M⁺).

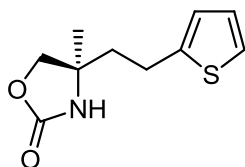
(4R)-Methyl-4-[2-(furan-2-yl)ethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one (46c)



(2R)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-*n*-hexanoyloxy-2-methyl-4-(furan-2-yl)-3-butene **45c** (19.3 g, 52.9 mmol)を THF (53.0 ml)および MeOH (53.0 ml)の混合液に溶解し、2 規定 NaOH 水溶液(53.0 ml)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液に水(50.0 ml)および CH₂Cl₂ (75.0 ml)を加えた後、CH₂Cl₂ (50.0 ml x 2)で抽出し、有機層を飽和食塩水(50.0 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、粗生成物 *tert*-butyl [(2R)-4-(furan-2-yl)-1-hydroxy-2-methylbut-3-en-2-yl]-carbamate (14.8 g, 100%)を得た。粗生成物を THF (150 ml)に溶解し、potassium *tert*-butoxide (7.20 g, 64.2 mmol)を THF (50.0 ml)に溶解した溶液を氷冷下 10 分間かけて加え、同温度下で 1 時間攪拌した。反応液に acetic acid (3.65 ml, 63.8 mmol)を加えて中和し、減圧下濃縮して、水(100 ml)および AcOEt(100 ml)を加え、AcOEt(100 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水(100 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 1:1)により精製して、標記化合物 **46c** (10.0 g, 98.0%)を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (s, 3H), 1.65 (s, 3H), 4.17 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.23 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.37 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 4.41 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 5.62 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 5.88 (br s, 1H), 6.18 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.21 (d, 1H, *J* = 12.7 Hz), 6.30 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz), 6.30 (br s, 1H), 6.04-6.37 (m, total 2H), 6.43 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.46 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz),

7.36 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.49 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz); IR (CDCl₃) 3451, 2252, 1757, 1396, 1374, 1281, 1165, 1044, 1016 cm⁻¹; MS (EI) m/z : 193 (M⁺).

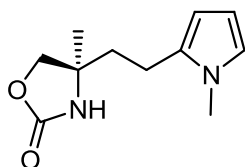
(4R)-Methyl-4-[2-(thiophen-2-yl)ethyl]oxazolidin-2-one (30a)



10% Palladium-charcoal (10% Pd-C) (50% wet, 4.50 g)を MeOH (30.0 ml)に懸濁し、(4R)-Methyl-4-[2-(thiophen-2-yl)ethenyl]oxazolidin-2-one **46a** (18.0 g, 86.0 mmol)を MeOH (150 ml)に溶解した溶液を加え、水素雰囲気下、室温で 10 時間攪拌した。反応液中の palladium-charcoal をセライトろ過した後、ろ液を減圧下留去した。残渣を Et₂O (20.0 ml)洗浄し、標記化合物 **30a** (16.5 g, 91.0% yield, 85.0% ee)を得た。なお、得られた **30a** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OD-H (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 60:40, 流速: 0.50 ml/min, 温度: 25.0°C. (S)-**30a** と (R)-**30a** の保持時間はそれぞれ 16.8 分と 17.6 分であった。[α]²⁵_D = +5.1 (*c* 2.4; CHCl₃); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (s, 3H), 2.08-1.92 (m, 2H), 3.00-2.84 (m, 2H), 4.08 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 4.19 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 5.39 (brs, 1H), 6.81 (d, 1H, $J = 3.6$ Hz), 6.93 (dd, 1H, $J = 5.2, 3.6$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz); IR (KBr): 3283, 1770, 1399, 1244, 1043, 941, 846, 775, 706, 691 cm⁻¹; MS (ESI) m/z : 211 (M⁺).

また、得られた標記化合物 **30a** (85.0% ee, 11.0 g)は、AcOEt (25.0 ml)と hexane (5.00 ml)を用いた再結晶操作を行うことで、光学純度の高い **30a** (4.00 g, 99.0% ee)へと変換することができた。[α]²⁵_D = +7.8 (*c* 2.0; CHCl₃).

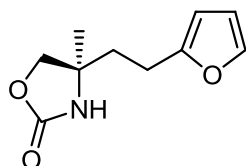
(4R)-Methyl-4-[2-(1-methylpyrrol-2-yl)ethyl]-1,3-oxazolidin-2-one (30b)



10% Pd-C (50% wet, 2.02 g)を MeOH (40.0 ml)に懸濁し、(4R)-4-methyl-4-[2-(1-methylpyrrol-2-yl)ethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one **46b** (20.3 g, 97.8 mmol)を MeOH (360 ml)に溶解した溶液を加え、水素雰囲気下、室温で 1 時間攪拌した。反応液中の palladium-charcoal をセライトろ過した後、ろ液を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:2)により精製して、標記化合物 **30b** (18.8 g,

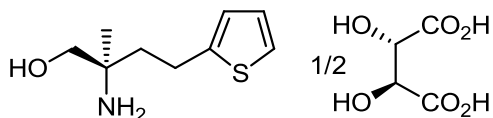
88.0% yield, 75.0% ee)を得た。なお、得られた **30b** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OJ (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 70:30, 流速: 1.0 ml/min, 温度: 25.0°C. (**S**)-**30b** と (**R**)-**30b** の保持時間はそれぞれ 12.5 分と 15.5 分であった。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (s, 3H), 2.00-1.87 (m, 2H), 2.70-2.58 (m, 2H), 4.07 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.14 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.15 (br s, 1H), 5.88 (br d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 6.05 (dd, 1H, *J* = 3.2, 2.4 Hz), 6.58 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz); IR (KBr) 3289, 3103, 2977, 2938, 1759, 1713, 1495, 1397, 1381, 1309, 1281, 1231, 1032, 945, 928, 776, 718, 706, 656 cm⁻¹; MS (EI) *m/z*: 208 (M⁺).

(4R)-Methyl-4-[2-(furan-2-yl)ethyl]-1,3-oxazolidin-2-one (30c)



10% Pd-C (50% wet, 1.00 g)を MeOH (20.0 ml)に懸濁し、(4R)-methyl-4-[2-(furan-2-yl)ethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one **46c** (10.0 g, 52.0 mmol)を MeOH (180 ml)に溶解した溶液を加え、水素雰囲気下、室温で 40 分間攪拌した。反応液中の palladium-charcoal をセライトろ過した後、ろ液を減圧下留去した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:2 to 1:1)により精製して、標記化合物 **30c** (7.95 g, 78.0% yield, 84.0% ee)を得た。なお、得られた **30c** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL AD (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 85:15, 流速: 1.0 ml/min, 温度: 25.0°C. (**S**)-**45c** と (**R**)-**45c** の保持時間はそれぞれ 13.1 分と 15.4 分であった。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.38 (s, 3H), 1.68-1.61 (m, 2H), 1.98-1.94 (m, 2H), 2.72 (t, 2H, *J* = 8.0 Hz), 4.04 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 4.11 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.92 (br s, 1H), 6.03 (d, 1H, *J* = 2.6 Hz), 6.29 (br d, 1H, *J* = 2.6 Hz), 7.31 (br s, 1H); IR (CDCl₃) 3450, 2975, 2928, 2250, 1755, 1599, 1508, 1400, 1381, 1147, 1045, 1010 cm⁻¹; MS (EI) *m/z*: 195 (M⁺).

(2R)-Amino-2-methyl-4-(thiophen-2-yl)butan-1-ol 1/2 D-(-)-tartrate (16a)



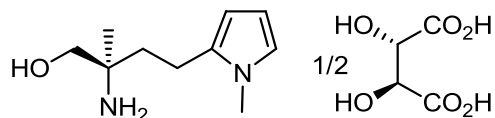
(4R)-Methyl-4-[2-(thiophen-2-yl)]ethyl]oxazolidin-2-one **30a** (85.0% ee, 7.30 g, 34.6 mmol)を THF (35.0 ml)および MeOH (70.0 ml)の混合液に溶解し、5 規定 KOH 水溶液 (70.0 ml)を加え、2 日間加熱還流した。冷却後、反応液に水 (150 ml)を加え、CH₂Cl₂

(150 ml x 2)で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣を EtOH (60.0 ml)に溶解し、D-(-)-tartrate (5.19 g, 34.6 mmol)の EtOH (50.0 ml)溶液を加えて 10 分間攪拌した後、析出した結晶をろ取し、粗結晶 **16a** (7.56 g)を得た。粗結晶(7.56 g)を EtOH (75.0 ml)と水(50.0 ml)の混合溶媒から再結晶し、標記化合物 **16a** (5.89 g, 98.0%*ee*)を無色板状晶として得た。得られた標記化合物 **16a** (5.89 g, 98.0%*ee*)に対し、EtOH (60.0 ml)と水(54.0 ml)で再結晶操作を再度行うことで、**16a** (5.11 g, 38.0% yield, 99.7%*ee*) が得られた。mp: 234-235°C; $[\alpha]_D^{24} = -14$ (*c* 1.0; H₂O); IR (KBr) 3400, 3218, 3126, 2937, 2596, 1599, 1530, 1400, 1124, 1077, 715 cm⁻¹. *Anal.* Calcd for C₉H₁₅NOS·0.5C₄H₄O₆: C, 50.95; H, 6.61; N, 5.40; S, 12.36. Found: C, 50.68; H, 6.91; N, 5.38; S, 12.48.

なお、**16a** の光学純度は、以下の操作により決定した。

(2*R*)-Amino-2-methyl-4-(thiophen-2-yl)butan-1-ol 1/2 D-(-)-tartrate **16a** (62.1 mg, 0.160 mmol)を CH₂Cl₂ (1.60 ml)に懸濁し、Boc₂O (176 mg, 0.810 mmol)、triethylamine (0.230 ml, 1.62 mmol)、および 4-dimethylaminopyridine (3.00 mg, 25.0 μmol)を加え、室温で 30 分間攪拌した。水(500 μl)を加え、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 1:1)により精製して、(4*R*)-Methyl-4-[2-(thiophen-2-yl)]ethyl]oxazolidin-2-one **30a** (20.0 mg, 60.0%)を得た。得られた **30a** は先に示した条件で HPLC 分析を行い、光学純度を決定した。

(2*R*)-Amino-2-methyl-4-(1-methylpyrrol-2-yl)butan-1-ol 1/2 D-(-)-tartrate (16b)



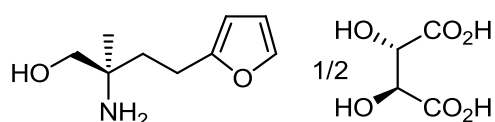
(4*R*)-Methyl-4-[2-(1-methylpyrrol-2-yl)ethyl]-1,3-oxazolidin-2-one **30b** (17.9 g, 86.0 mmol)を THF (250 ml)および MeOH (125 ml)の混合液に溶解し、5 規定 KOH 水溶液 (125 ml)を加え、4 日間加熱還流した。冷却後、反応液に水(200 ml)を加え、CH₂Cl₂ (200 ml x 2)で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣を EtOH (260 ml)に溶解し、D-(-)-tartrate (6.45 g, 43.0 mmol)を加えて 2 時間攪拌した後、析出した結晶をろ取し、粗結晶(20.7 g)を得た。粗結晶(18.7 g)を EtOH (370 ml)と水(37.0 ml)の混合溶媒から再結晶し、得られた結晶を再度 EtOH (300 ml)と水(30.0 ml)の混合溶媒から再結晶し、さらに得られた結晶を再度 EtOH (240 ml)と水(24.0 ml)の混合溶媒から再結晶して、標記化合物 **16b** (10.5 g, 47.0% yield, 99.7%*ee*)を無色鱗片状晶として得た。mp: 198-199°C; $[\alpha]_D^{24} = -13$ (*c* 1.0; H₂O); IR (KBr) 3480, 3430, 2926, 2634, 2545, 1586, 1516, 1389, 1359, 1309, 1291, 1105, 1039, 710, 690 cm⁻¹; MS (FAB) *m/z*: 183 (M+H)⁺ as free form of title compound. *Anal.* Calcd for

C₁₀H₁₈N₂O·0.5C₄H₄O₆: C; 56.01, H; 8.23, N; 10.89. Found: C; 55.81, H; 8.22, N; 10.89.

なお、**16b** の光学純度は、以下の操作により決定している。

(2*R*)-Amino-2-methyl-4-(1-methylpyrrol-2-yl)butan-1-ol 1/2 D-(-)-tartrate **16b** (41.4 mg, 0.160 mmol)を CH₂Cl₂ (1.60 ml)に懸濁し、Boc₂O (176 mg, 0.810 mmol)、triethylamine (0.230 ml, 1.62 mmol)、および 4-dimethylaminopyridine (2.00 mg, 16.0 μmol)を加え、室温で 30 分間攪拌した。水(500 μl)を加え、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:2 to 2:1)により精製して、(4*R*)-methyl-4-[2-(1-methylpyrrol-2-yl)ethyl]-1,3-oxazolidin-2-one **30b** (17.7 mg, 53.0%)を得た。得られた **30b** は先に示した条件で HPLC 分析を行い、光学純度を決定した。

(2*R*)-Amino-2-methyl-4-(furan-2-yl)butan-1-ol 1/2 D-(-)-tartrate (16c)

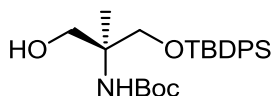


(4*R*)-Methyl-4-[2-(furan-2-yl)ethyl]-1,3-oxazolidin-2-one **30c** (29.9 g, 153 mmol)を THF (150 ml)および MeOH (150 ml)の混合液に溶解し、5 規定 KOH 水溶液(150 ml)を加え、3 日間加熱還流した。冷却後、反応液に水(100 ml)を加え、CH₂Cl₂ (100 ml x 2)で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣を EtOH (250 ml)に溶解し、D-(-)-tartrate (11.5 g, 76.6 mmol)の EtOH (100 ml)溶液を加えて 10 分間攪拌した後、析出した結晶をろ取り、得られた結晶を再度 EtOH (300 ml)と水(75.0 ml)の混合溶媒から再結晶して、標記化合物 **16c** (24.4 g, 65.0% yield, 99.3% ee)を無色板状晶として得た。mp: 200-204°C; [α]²⁴_D = -13 (*c* 1.0; MeOH), -12 (*c* 1.0; H₂O); IR (KBr) 3405, 3226, 3135, 2943, 2597, 1598, 1528, 1401, 1299, 1228, 1124, 1079, 1003, 740 cm⁻¹; MS (FAB) *m/z*: 170 (M+H)⁺ as free form of title compound. *Anal.* Calcd for C₉H₁₅NO₂·0.5C₄H₄O₆: C; 54.09, H; 7.43, N; 5.73. Found: C; 53.93, H; 7.30, N; 5.79.

なお、**16c** の光学純度は、以下の操作により決定した。

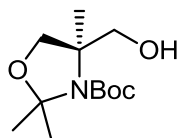
(2*R*)-Amino-2-methyl-4-(furan-2-yl)butan-1-ol 1/2 D-(-)-tartrate **16c** (51.2 mg, 0.160 mmol)を CH₂Cl₂(1.60 ml)に懸濁し、Boc₂O (176 mg, 0.810 mmol)、triethylamine (0.230 ml, 1.62 mmol)、および 4-dimethylaminopyridine (3.00 mg, 0.0250 mmol)を加え、室温で 20 分間攪拌した。水(500 μl)を加え、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 1:1)により精製して、(4*R*)-methyl-4-[2-(furan-2-yl)ethyl]-1,3-oxazolidin-2-one **30c** (18.0 mg, 58.0%)を得た。得られた **30c** は先に示した条件で HPLC 分析を行い、光学純度を決定した。

(S)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-[(*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy]-2-methylpropanol (55)



(2*R*)-*tert*-Butoxycarbonylamino-3-hexanoyloxy-2-methyl-1-propanol (*R*)-**17a** (6.9 g, 23 mmol) の CH₂Cl₂ (50 ml) 溶液に、氷冷下、imidazole (4.6 g, 68 mmol) と *tert*-butyldiphenylsilylchloride (TBDMSCl) (9.3 g, 34 mmol)を加えた後、室温まで昇温し、2時間攪拌した。反応液に Et₂O (1000 ml)を加えた後、析出した不溶物をセライトろ過し、ろ液を減圧下、濃縮した。得られた残渣を MeOH (45 ml) と THF (45 ml) で希釈し、0°Cに冷却した後、1規定 NaOH 水溶液(45 ml)を加えた。室温で3時間攪拌後、溶媒を減圧下にて留去した。CH₂Cl₂ (50 ml x 3)で抽出した後、有機層を飽和食塩水(50 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 20:1 to 5:1)により精製して、標記化合物 **55** (8.4 g, 84%)を無色油状物質として得た。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.08 (s, 9H), 1.23 (s, 3H), 1.44 (s, 9H), 1.61 (brs, 1H), 3.53-3.77 (m, 4H), 5.12 (brs, 1H), 7.30-7.45 (m, 6H), 7.55-7.65 (m, 4H); IR (KBr) 3424, 1715, 1696 cm⁻¹; MS (FAB) *m/z*: 444 (M⁺); *Anal.* Calcd for C₂₅H₃₇NO₄Si: C, 67.68; H, 8.41; N, 3.16. Found: C, 67.49; H, 8.34; N, 3.20.

(R)-N-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2,2,4-trimethyl-3-oxazolidine (56)
:starting from (S)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-[(*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy]-2-methylpropanol (55)



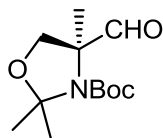
(*S*)-2-[(*tert*-Butoxycarbonyl)amino]-3-[(*tert*-butyldiphenylsilyl)oxy]-2-methylpropanol **55** (8.4 g, 19 mmol)の CH₂Cl₂ (100 ml)溶液に、2,2-dimethoxypropane (23 ml, 0.19 mol) と BF₃-OEt₂ (0.12 ml, 1.0 mmol)を加えた後、室温で1時間攪拌した。反応液に triethylamine (5.0 ml)を加えた後、減圧下溶媒を留去した。残渣を THF(1.0 x 10² ml)に溶解させ、0°Cにて、TBAF (in THF, 1M, 29 ml, 29 mmol)を加え、室温まで昇温した後、5時間攪拌した。反応液に水(100 ml)を加え、AcOEt (50 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水(50 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 10:1 to 1:1)により精製して、標記化合物 **56** (3.4 g, 93%)を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.43 (s, 3H), 1.49 (s, 9H), 1.56 (s, 6H), 3.75-3.52 (m,

4H), 4.55 (brs, 1H), 4.57 (brs, 1H); IR (KBr) 3461, 2978, 1696, 1673, 1395, 1368, 1256, 1175, 1095 cm^{-1} ; MS(FAB) m/z : 247 (M+H)⁺.

:starting from (2S)-tert-Butoxycarbonylamino-3-butanoyloxy-2-methyl-1-propanol ((S)-44)

(2S)-tert-Butoxycarbonylamino-3-butanoyloxy-2-methyl-1-propanol (S)-44 (19 g, 70 mmol)の CH_2Cl_2 (2.0×10^2 ml)溶液に、室温で 2,2-dimethoxypropane (83 ml, 0.70 mol)と $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ (0.40 ml, 3.4 mmol)を加え、1時間攪拌した。反応液に triethylamine (10 ml)を加えた後、減圧下溶媒を留去し、粗製の tert-butyl (4S)-4-(butanoyloxymethyl)-2,2,4-trimethyl-oxazolidine-3-carboxylate を黄色油状物質として得た。得られた粗生成物を THF (100 ml)と MeOH (160 ml)に希釈した後、1規定 NaOH 水溶液(70 ml)を加え、室温で 20 分間攪拌した。減圧下溶媒を留去して、水(150 ml)を加えた後、 CH_2Cl_2 (100 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水(50 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 10:1 to 2:1)により精製して、標記化合物 56 (16 g, 91%)を淡黄色油状物質として得た。

(S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-4-formyl-2,2,4-trimethyl-3-oxazolidine (19)



Oxalyl chloride (2.18 g, 17.2 mmol)の CH_2Cl_2 (30.0 ml)溶液を -78°C に冷却した後、Dimethylsulfoxide (DMSO) (2.23 g, 28.6 mmol)を加え、同温で 5 分間攪拌した。反応液に、(R)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-4-hydroxymethyl-2,2,4-trimethyl-3-oxazolidine 56 (3.52 g, 14.3 mmol)の CH_2Cl_2 (30.0 ml)溶液を加え、 -78°C で 15 分間攪拌した後、triethylamine(5.79 g, 57.2 mmol)を加えた。反応液を室温まで昇温し、飽和重曹水(70.0 ml)を加え反応を停止させた後、 Et_2O (70.0 ml)を加えた。有機層を 1 規定 KHSO_4 水溶液 (30.0 ml)、飽和重曹水(70.0 ml)、飽和食塩水(70.0 ml)で順に洗浄した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 9:1)により精製して、標記化合物 19 (3.34 g, 96.0%)を白色固体として得た。¹H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.30-1.70 (m, 18H), 3.65-3.68 (2d, 1H, $J = 6.9$ Hz), 3.92 (d, 1H, $J = 9.3$ Hz), 9.39-9.46 (2s, 1H); IR (KBr) 1699, 1368, 1354 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z : 245 (M)⁺; Anal. Calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_4$: C, 59.24; H, 8.70; N, 5.76. Found: C, 59.52; H, 8.76; N, 5.71.

Biology

Inhibitory activities against Host versus Graft Reaction in rats (HvGR)

試験には、2系統のラット [Lewis (雄、6週齢、日本チャールス・リバー株式会社) と WKAH/Hkm (雄、7週齢、日本エスエルシー株式会社)] を使用した。1群5匹のラット (宿主) を用いた。まず、以下の操作により、HvGR の誘導を行った。WKAH/Hkm ラットまたは Lewis ラットの脾臓から脾臓細胞を単離し、RPMI1640 培地 (ライフテクノロジー社製) で濃度 1×10^8 個/ml の脾臓細胞浮遊液を作製した。WKAH/Hkm ラット脾臓細胞浮遊液 0.1 ml を Lewis ラットの両後肢足蹠皮内 (HvGR 誘発群)、または Lewis ラットの脾臓細胞浮遊液 0.1 ml を Lewis ラットの両後肢足蹠皮内 (同系群) に注射した。次に、化合物投与を行った。まず、試験用化合物を、0.5%トラガカント液で、それぞれ 0.8 mg/5 ml、0.08 mg/5 ml および 0.008 mg/5 ml の濃度に懸濁した。調製した懸濁液と 0.5%トラガカント液を、それぞれ、体重 1 kg 当たり 5 ml の割合で、1日1回、脾臓細胞注射日から4日間連日でラットに経口投与した。また、同系群 (Lewis ラット脾臓細胞を注射され、化合物を投与されない Lewis ラット) と対照群 (WKAH/Hkm ラット脾臓細胞を注射され、化合物を投与されない Lewis ラット) には、0.5%トラガカント液を経口投与した。

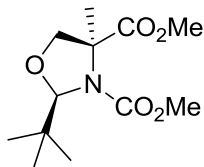
各個体の膝窩リンパ節重量から同系群の平均膝窩リンパ節重量を引き (「HvGR による膝窩リンパ節重量」= (G1)、対照群の平均「HvGR による膝窩リンパ節重量」= (G2) に対する化合物投与群の各個体の「HvGR による膝窩リンパ節重量」= (G3) から抑制率を算出する (式 2)

$$\text{抑制率(\%)} = (G2-G1)/G3 \times 100 \quad (\text{式 2})$$

なお、ID₅₀ 値 (mg/kg) は化合物の投与量と抑制率から最小二乗法を用いて算出した。

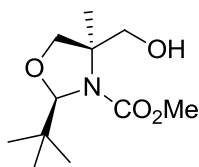
第 3 章に関する実験

Dimethyl (2*R*,4*S*)-2-*tert*-butyl-4-methyl-1,3-oxazolidine-3,4-dicarboxylate (67)



Dimethyl (2*R*,4*S*)-2-*tert*-butyl-1,3-oxazolidine-3,4-dicarboxylate **66**⁵²⁾ (384 g, 1.57 mol)の THF (2.30 l)溶液に、窒素雰囲気下、*N,N'*-dimethylpropyleneurea (DMPU) (380 ml)と methyl iodide (290 ml, 4.70 mol)を加え、-20°Cに冷却した。反応液が-5°C以上にならないように留意しつつ、lithium bis(trimethylsilyl)amide (LiHMDS) (1.0 M in THF, 1.80 l, 1.80 mol)をゆっくりと滴下した。滴下後、さらに-10°Cで1時間攪拌した。反応液に10% NH₄Cl水溶液(300 ml)を加えた後、toluene (500 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和食塩水(200 ml x 2)で洗浄した後、減圧下溶媒を留去し、標記化合物 **67** (373 g, 92.0%)を無色油状物質として得た。得られた化合物は精製操作を行うことなく、次の反応に使用した。[α]_D²⁷ = -9.7 (*c* 1.0, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.97(s, 9H), 1.62 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.82 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.28 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.15 (s, 1H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 21.2, 26.3, 39.0, 52.4, 52.6, 66.5, 76.9, 97.6, 155.1, 172.2; IR (Liquid Film) 2958, 2909, 1737, 1719, 1478, 1443, 1345, 1313, 1282, 1249, 1218, 1195, 1141, 1115, 1059, 1034 cm⁻¹; MS (FAB) *m/z*: 260 (M+H)⁺.

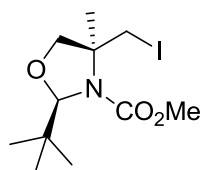
Methyl (2*R*,4*R*)-2-*tert*-butyl-4-hydroxymethyl-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (26)



Lithium chloride (132 g, 3.13 mol)と lithium borohydride (68.0 g, 3.13 mol)に窒素雰囲気下、THF (3.80 l)を加え、1時間攪拌した。反応液に、dimethyl (2*R*,4*S*)-2-*tert*-butyl-4-methyl-1,3-oxazolidine-3,4-dicarboxylate **67** (373 g, 1.44 mol)の toluene (1.15 l)溶液を滴下した後、室温で3時間攪拌した。氷浴下、反応液を冷却し、10% NH₄Cl水(300 ml)をゆっくりと滴下した後、toluene (500 ml x 2)で抽出した。有機層を水(500 ml)で洗浄した後、減圧下溶媒を留去し、標記化合物 **26** (327 g, 98.0%)を無色油状物質として得た。得られた化合物は精製操作を行うことなく、次の反応に使用した。[α]_D²⁷ = +13 (*c* 1.0, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 0.93 (s, 9H), 1.43 (s, 3H), 3.55

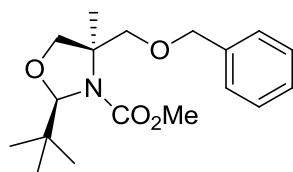
(d, 1H, $J = 11.3$ Hz), 3.71 (s, 3H), 3.74 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 3.83 (d, 1H, $J = 11.3$ Hz), 3.87 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 5.13 (s, 1H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ 19.5, 26.4, 38.6, 52.5, 65.2, 67.1, 75.8, 97.3, 156.8; IR (Liquid Film) 3440, 2959, 2909, 2875, 1709, 1686, 1479, 1447, 1399, 1358, 1317, 1281, 1196, 1172, 1134, 1112, 1069, 1047, 960, 805, 759 cm^{-1} ; MS (FAB) m/z : 232 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

Methyl (2R,4S)-2-tert-butyl-4-(iodomethyl)-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (68)



Iodine (I_2) (0.13 g, 0.52 mmol)の toluene (10 ml)溶液に triphenylphosphine (0.14 g, 0.52 mmol)を加え、 60°C で 30 分間攪拌した後、methyl (2R,4R)-2-tert-butyl-4-hydroxymethyl-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **26** (0.10 g, 0.43 mmol)の toluene (3.5 ml)溶液と、imidazole (35 mg, 0.52 mmol)を加え、 60°C で 1 時間攪拌した。反応液中の不溶物をろ別した後、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 20:1 to 5:1)により精製して、標記化合物 **68** (53 mg, 36%)を無色油状物質として得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (s, 9H), 1.56 (s, 3H), 3.36 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz), 3.65 (s, 3H), 3.75 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 3.78 (d, 1H, $J = 9.4$ Hz), 4.02 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 5.22 (s, 1H); MS(ESI) m/z : 342 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

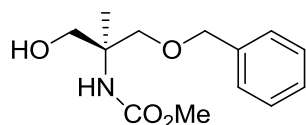
Methyl (2R,4R)-4-[(benzyloxy)methyl]-2-tert-butyl-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (69)



Methyl (2R,4R)-2-tert-butyl-4-(hydroxymethyl)-4-methyl-oxazolidine-3-carboxylate **26** (11.0 g, 48.0 mmol)の DMF (100 ml)溶液を 0°C に冷却した後、sodium hydride (60% in mineral oil, 2.20 g, 58.0 mmol)を加え、10 分間攪拌した。同温にて、benzylbromide (10.7 g, 62.0 mmol)を加えた後、室温まで昇温し、2 時間攪拌した。反応液に飽和 NH_4Cl 水溶液(100 ml)を加え、AcOEt(200 ml x 2)で抽出した。有機層を水(100 ml)、飽和食塩水(100 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 5:1 to

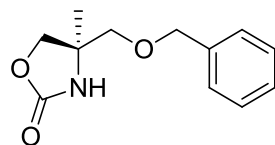
3:1)により精製して、標記化合物 **69** (13.6 g, 88.0%)を淡黄色油状物質として得た。
 $[\alpha]_D^{20} = -14$ (c 1.0, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.89 (s, 9H), 1.39 (s, 3H), 3.63 (m, 1H), 3.64 (s, 3H), 3.86 (brs, 1H), 3.72 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.13 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.51 (q, 2H, $J = 11.7$ Hz), 5.11 (brs, 1H), 7.24-7.35 (m, 5H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 20.6, 26.5, 38.6, 52.0, 63.4, 73.5, 74.7; IR (KBr) 2954, 1707, 1441, 1338, 1311, 1174, 1111, 1063, 1028, 958, 737, 698 cm⁻¹; MS (FAB) m/z : 322 (M+H)⁺; HRMS (ESI): calcd for C₁₈H₂₈NO₄ [M+H]⁺ 322.2022, found 322.2018.

Methyl [(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-hydroxy-2-methylpropan-2-yl]carbamate (**70**)



Methyl (2*R*,4*R*)-4-[(benzyloxy)methyl]-2-*tert*-butyl-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **69** (9.90 g, 25.0 mmol)の MeOH (120 ml)溶液に *p*-TsOH monohydrate (1.50 g, 8.50 mmol)を加え、加熱還流下、1時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、粗生成物として標記化合物 **70** (13.6 g)を淡黄色油状物質として得た。得られた **70** は精製操作を行うことなく、次の反応に使用した。MS (FAB) m/z : 254 (M+H)⁺.

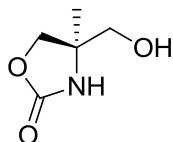
(4*R*)-4-[(Benzyloxy)methyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (**71**)



粗生成物である methyl [(2*S*)-1-(benzyloxy)-3-hydroxy-2-methylpropan-2-yl]-carbamate **70** (13.6 g, <25.0 mmol)の THF (200 ml)溶液に、室温で potassium *tert*-butoxide (7.70 g, 68.0 mmol)を加え、3時間攪拌した。反応液に1規定 HCl 水溶液 (100 ml)を加えた後、AcOEt (100 ml x 2)で抽出した。有機層を水(100 ml)、飽和食塩水(100 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:1 to 1:2)により精製して、標記化合物 **71** (8.80 g, 95.0% for 2 steps)を無色油状物質として得た。なお、得られた **71** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OD (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 85:15, 流速: 1.0 ml/min, 温度: 25.0°C. (*S*)-**71** と (*R*)-**71** の保持時間はそれぞれ 6.2分と 9.0分であった。
 $[\alpha]_D^{20} = +7.3$ (c 1.0, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (s, 3H), 3.35 (d, 2H, $J = 4.4$ Hz), 4.00 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.19 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.53 (d, 2H, $J = 2.4$ Hz), 5.26 (s, 1H), 7.27-7.36 (m, 5H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 23.0, 57.3, 73.4, 73.6, 75.1,

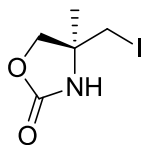
127.7, 128.0, 128.5, 137.5, 159.2; IR (KBr) 3271, 1738, 1383, 1254, 1194, 1097, 1039, 933, 737, 698 cm^{-1} ; MS (FAB) m/z : 222 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_3$ [$\text{M}+\text{H}$]⁺ 222.1130, found 222.1121.

(4R)-4-(Hydroxymethyl)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (72)



(4R)-4-[(Benzyloxy)methyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one **71** (2.6 g, 12 mmol) の EtOH (150 ml) 溶液に、potassium carbonate (6.0 g, 43 mmol) と 10% Pd-C (50% wet, 4.0 g) を加え、水素雰囲気下、室温で 3 時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮し、標記化合物 **72** (2.6 g, 91%) を無色固体物質として得た。なお、得られた化合物は精製することなく、次の反応に使用した。¹H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ 1.22 (s, 3H), 3.37 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz), 3.43 (d, 1H, $J = 11.2$ Hz), 3.98 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz), 4.29 (d, 1H, $J = 8.6$ Hz); MS (FAB) m/z : 132 ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

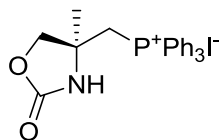
(4S)-4-(Iodomethyl)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (73)



粗生成物である(4R)-4-(hydroxymethyl)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one **72** (4.2 g, <31 mmol) の pyridine (40 ml) 溶液に *p*-TsCl (8.9 g, 46 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。その後、反応液に 1 規定 HCl 水溶液(100 ml)を加え、 CH_2Cl_2 (100 ml x 2) で抽出した。有機層を 2 規定 HCl 水溶液(50 ml)、飽和食塩水(50 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、粗生成物としてトシル化合物を得た。得られたトシル化合物を acetone (120 ml) に溶解した後、NaI (18 g, 0.12 mol) を加え、加熱還流下、12 時間攪拌した。不溶物をろ過した後、ろ液を減圧下濃縮した。残渣に水を加え、AcOEt (150 ml) で抽出し、有機層を飽和 Na_2SO_3 水溶液(50 ml)、飽和食塩水(50 ml)で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 2:1 to 1:2)により精製して、標記化合物 **73** (5.8 g, 78% for 2 steps) を無色油状物質として得た。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15$ (c 1.0, CH_3OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.58 (s, 3H), 3.31 (d, 2H, $J = 4.9$ Hz), 4.15 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.28 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 5.68 (brs, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 15.1, 25.4, 57.2, 74.9, 158.5; IR (KBr) 3248, 1776, 1401, 1289, 1214, 1140, 1051, 956, 762 cm^{-1} ; MS (FAB) m/z : 242 ($\text{M}+\text{H}$)⁺; HRMS (ESI): calcd for

C₅H₉NO₂I [M+H]⁺ 241.9678, found 241.9687.

**{[(4S)-4-Methyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-4-yl]methyl}(triphenyl)phosphonium iodide
(24b)**

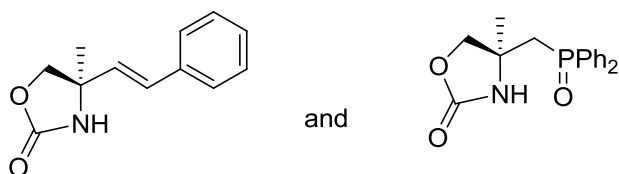


(4S)-4-(Iodomethyl)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one **73** (4.20 g, 17.0 mmol) の DMF(20.0 ml)溶液に、PPh₃ (46.0 g, 174 mmol)を加え、110°Cで3時間攪拌した。反応液を MeOH/AcOEt (20.0 ml/50.0 ml)で希釈した後、室温で1日放置した。2層に分離した反応液の上層液体をデカントして除いた後、下層液体を減圧下濃縮し、粗生成物として標記化合物 **24b** (7.00 g)を得た。得られた粗生成物は再度 MeOH/AcOEt (20.0 ml/200 ml)を用いて再結晶操作を行い、高純度の **24b** (5.0 g, 57%)を白色固体として得た。mp: 106-110°C; [α]²⁰_D = -37 (*c* 1.6, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.73 (s, 3H), 3.81-3.87 (m, 2H), 4.40 (dd, 1H, *J* = 3.2, 12.8 Hz), 4.76 (dd, 1H, *J* = 3.2, 12.8 Hz), 6.52 (s, 1H), 7.71-7.75 (m, 6H), 7.80-7.84 (m, 3H), 7.97-8.01 (m, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 30.3 (d, *J* = 8.0 Hz), 32.2 (d, *J* = 49.1 Hz), 57.0 (d, *J* = 4.6 Hz), 74.8, 118.0 (d, *J* = 85.9 Hz), 130.7 (d, *J* = 12.7 Hz), 134.0 (d, *J* = 10.3 Hz), 135.3 (d, *J* = 3.0 Hz), 157.2; IR (KBr) 3394, 3225, 2854, 1741, 1438, 1108, 1052, 747, 690 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₂₃H₂₃INO₂P [M-I]⁺ 376.1466, found 376.1461.

(4R)-4-Methyl-4-[(E)-2-phenylethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one (20a)

(4S)-4-(diphenylphosphorylmethyl)-4-methyl-oxazolidin-2-one (24-O)

:typical procedure of a Wittig reaction.



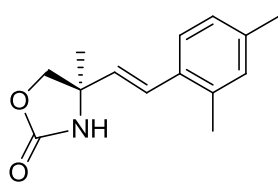
窒素雰囲気下、ホスホニウム塩 **24b** (0.50 g, 1.0 mmol, 2.0 eq.)の THF(5.0 ml)溶液を-78°Cに冷却し、*n*-butyllithium (1.9 M in hexane, 1.0 ml, 2.0 mmol, 3.9 eq.)をゆっくりと滴下し、同温で30分間攪拌した。反応液に benzaldehyde **25a** (54 mg, 0.50 mmol, 1.0 eq.)を加えた後、徐々に昇温し、室温で2時間攪拌した。その後、飽和 NH₄Cl水溶液(10 ml)を加え、AcOEt (10 ml x 2)で抽出した。有機層を水(10 ml)と飽和食塩水(10 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:1 to 1:1)により

精製して、標記化合物 **20a** (0.10 g, 99% yield, 98.6% ee) を無色固体として得ると同時に、(4*S*)-4-(diphenylphosphorylmethyl)-4-methyl-oxazolidin-2-one **24-O** (0.16 g, 99% yield) を得た。なお、得られた **20a** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL IA (4.6φ x 250 mm), hexane:ethanol = 95:5 (0 min) – 50:50 (8.0 min), 流速: 2.0 ml/min, 温度: 25.0°C. 保持時間は(*S*)-**20a** と(*R*)-**20a** はそれぞれ 4.6 分と 5.3 分であった。

(化合物 **20a**) mp: 155.4-155.6°C; $[\alpha]_D^{20} = -61$ (*c* 0.27, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.53 (s, 3H), 4.17 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.23 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.09 (s, 1H), 6.21 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.59 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.26-7.36 (m, 5H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 25.6, 58.5, 76.5, 126.7, 128.3, 128.7, 130.1, 131.2, 135.7, 159.0; IR (KBr) 3293, 1756, 1710, 1393, 1288, 1171, 1042, 967, 751, 659 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z*: 203 (M)⁺; Anal. Calcd for C₁₂H₁₃NO₂: C, 70.92; H, 6.45; N, 6.89. Found: C, 70.80; H, 6.49; N, 6.83.

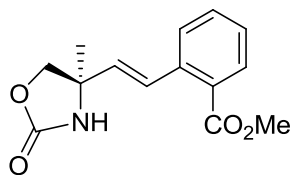
(化合物 **24-O**) mp: 180.6-181.4°C; $[\alpha]_D^{20} = +9.1$ (*c* 0.41, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.34 (s, 3H), 4.09 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 2.60-2.78 (m, 2H), 4.21 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 6.44 (brs, 1H), 7.46-7.57 (m, 5H), 7.67-7.71 (m, 2H), 7.78-7.82 (m, 2H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 26.7, 39.9 (d, *J* = 69.1 Hz), 57.3 (d, *J* = 4.8 Hz), 77.4 (d, *J* = 12.5 Hz), 128.9 (d, *J* = 3.6 Hz), 129.0 (d, *J* = 3.6 Hz), 130.3 (d, *J* = 9.5 Hz), 130.6 (d, *J* = 9.5 Hz), 132.2, 132.3, 132.8 (d, *J* = 90.6 Hz), 133.6 (d, *J* = 93.0 Hz), 157.7; IR (KBr) 3308, 1758, 1439, 1255, 1175, 1034, 930, 752, 699 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₇H₁₉NO₃P [M+H]⁺ 316.1103, found 316.1105.

(4*R*)-4-[(*E*)-2-(2,4-Dimethylphenyl)ethenyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (**20b**)



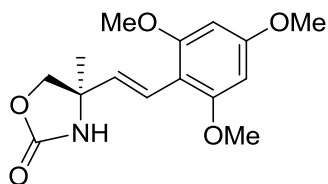
標記化合物 **20b** は 2,4-dimethylbenzaldehyde **25b** を用いて、**20a** と同様の合成方法により黄色固体として得た (72% yield, *E/Z* = >99/1)。mp: 114.6-115.5°C; $[\alpha]_D^{20} = -43$ (*c* 0.19, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.56 (s, 3H), 2.28 (s, 6H), 4.17 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.23 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.03 (brs, 1H), 6.05 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 6.77 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 6.96 (s, 1H), 6.97 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.27 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 19.7, 21.1, 25.7, 58.7, 76.6, 125.6, 127.0, 127.8, 131.2, 131.6, 132.0, 135.6, 138.0, 158.9; IR (KBr) 3206, 3112, 2970, 2871, 1782, 1736, 1403, 1291, 1037, 984 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₄H₁₈NO₂ [M+H]⁺ 232.1338, found 232.1337.

Methyl 2-[(E)-2-[(4R)-4-methyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-4-yl]ethenyl]benzoate (20c)



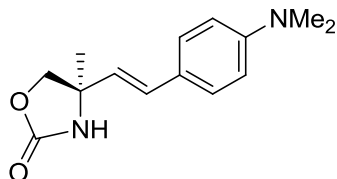
標記化合物 **20c** は 2-methoxycarbonylbenzaldehyde **25c** を用いて、**20a** と同様の合成方法により淡黄色固体として得た (75% yield, *E/Z* = >99/1)。 mp: 86.9-90.5°C; $[\alpha]_D^{20} = -18$ (*c* 0.17, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.59 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 4.18 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.26 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.20 (brs, 1H), 6.06 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.34 (m, 1H), 7.42 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 7.45-7.50 (m, 2H), 7.92 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 25.3, 52.2, 58.7, 76.3, 127.6, 127.8, 128.6, 129.8, 130.7, 132.3, 133.7, 138.0, 158.9, 167.5; IR (KBr) 3206, 3112, 2970, 2871, 1782, 1736, 1403, 1291, 1037, 984 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₄H₁₆NO₄ [M+H]⁺ 262.1079, found 262.1077.

(4R)-4-[(E)-2-(2,4,6-Trimethoxyphenyl)ethenyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (20d)



標記化合物 **20d** は 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde **25d** を用いて、**20a** と同様の合成方法により淡灰色固体として得た (89% yield, *E/Z* = >99/1)。 mp: 108.2-119.7°C; $[\alpha]_D^{20} = -27$ (*c* 0.22, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.59 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.86 (s, 6H), 4.20 (d, 1H, *J* = 10.5 Hz), 4.28 (d, 1H, *J* = 10.5 Hz), 5.26 (brs, 1H), 6.16 (s, 2H), 6.60 (d, 1H, *J* = 20.5 Hz), 6.86 (d, 1H, *J* = 20.5 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 25.7, 55.3, 55.7, 59.3, 77.1, 90.5, 106.0, 120.3, 131.7, 158.8, 159.4, 160.6; IR (KBr) 3313, 2941, 1764, 1732, 1605, 1460, 1230, 1124, 1039, 817 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₅H₂₀NO₅ [M+H]⁺ 294.1341, found 294.1358.

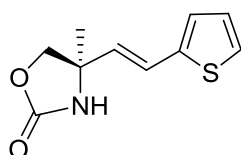
(4R)-4-[(E)-2-(4-Dimethylaminophenyl)ethenyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (20e)



標記化合物 **20e** は 4-dimethylaminobenzaldehyde **25e** を用いて、**20a** と同様の合成方法により無色固体として得た (63% yield, *E/Z* = >99/1)。 mp: 136.7-137.5°C; $[\alpha]_D^{20} = -77$

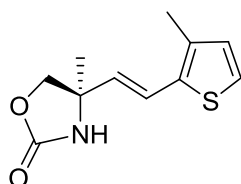
(*c* 0.090, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.56 (s, 3H), 2.97 (s, 6H), 4.16 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 4.23 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 5.25 (brs, 1H), 6.02 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 6.51 (d, 1H, *J* = 15.9 Hz), 6.69 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.26 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 25.5, 40.5, 58.5, 76.8, 112.5, 126.5, 127.6, 130.1, 150.1, 158.7; IR (KBr) cm⁻¹: 3372, 3253, 2904, 1768, 1720, 1608, 1522, 1355, 1188, 1035, 966, 806, 770 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₄H₁₉N₂O₂ [M+H]⁺ 247.1447, found 247.1439.

(4R)-4-Methyl-4-[(E)-2-(thiophen-2-yl)ethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one (46a)



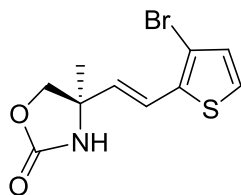
標記化合物 **46a** は 2-formylthiophene **25f** を用いて、**20a** と同様の合成方法により黄色油状物質として得た (75% yield, *E/Z* = >99/1)。[α]_D²⁰ = -63 (*c* 0.38, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.49 (s, 3H), 4.16 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 4.22 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 5.03 (s, 1H), 6.04 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.71 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.94-6.98 (m, 2H), 7.18 (d, 1H, *J* = 5.4 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 25.2, 58.5, 76.5, 123.5, 125.1, 127.0, 127.6, 130.5, 140.7, 159.1; IR (KBr) 3264, 1735, 1388, 1280, 1034, 956, 697 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₀H₁₁NO₂S [M+H]⁺ 210.0589, found 210.0594.

(4R)-4-Methyl-4-[(E)-2-(3-methylthiophen-2-yl)ethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one (20g)



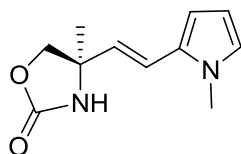
標記化合物 **20g** は 2-formyl-3-methylthiophene **25g** を用いて、**20a** と同様の合成方法により淡黄色油状物質として得た (99% yield, *E/Z* = >99/1)。[α]_D²⁰ = -36 (*c* 0.62, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.54 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 4.16 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.22 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.01 (brs, 1H), 5.97 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 6.72 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 6.78 (d, 1H, *J* = 4.9 Hz), 7.07 (d, 1H, *J* = 4.9 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 50.7, 58.7, 76.6, 121.8, 123.6, 129.8, 130.8, 134.2, 136.4, 159.1; IR (KBr) 3218, 1730, 1401, 1286, 1173, 1036, 957, 724 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₁H₁₄NO₂S [M+H]⁺ 224.0745, found 224.0746.

(4R)-4-[(E)-2-(3-Bromothiophen-2-yl)ethenyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (20h)



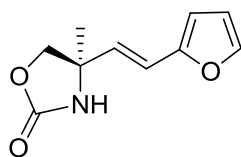
標記化合物 **20h** は 3-bromo-2-formylthiophene **25h** を用いて、**20a** と同様の合成方法により淡黄色油状物質として得た (66% yield, *E/Z* = >99/1)。 $[\alpha]_D^{20} = -41$ (*c* 1.0, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.57 (s, 3H), 4.17 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.23 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.08 (brs, 1H), 6.12 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.77 (d, 1H, *J* = 16.1 Hz), 6.93 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz), 7.17 (d, 1H, *J* = 5.9 Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 25.4, 58.5, 76.2, 111.73, 122.0, 124.9, 130.9, 132.6, 135.0, 158.7; IR (KBr) 3220, 3107, 1744, 1727, 1402, 1295, 1036, 961, 870, 727 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₀H₁₁NO₂SBr [M+H]⁺ 287.9694, found 287.9691.

(4R)-4-Methyl-4-[(E)-2-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)ethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one (46b)



標記化合物 **46b** は 2-formyl-1-methylpyrrole **25i** を用いて、**20a** と同様の合成方法により淡黄色油状物質として得た (83% yield, *E/Z* = >99/1)。 $[\alpha]_D^{20} = -31$ (*c* 0.23, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.52 (s, 3H), 3.60 (s, 3H), 4.15 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.19 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.00 (s, 1H), 5.95 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 6.08 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 6.33 (dd, 1H, *J* = 2.0, 3.2 Hz), 6.46 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz), 6.59 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 25.8, 34.1, 58.6, 76.8, 107.0, 108.2, 118.7, 123.8, 127.9, 129.8, 158.9; IR (KBr) 3278, 1734, 1478, 1375, 1033, 957, 712 cm⁻¹; MS(FAB) *m/z*: 207 (M+H)⁺; HRMS (ESI): calcd for C₁₁H₁₄N₂O₂ [M+H]⁺ 207.1134, found 207.1127.

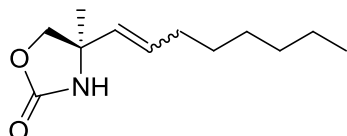
(4R)-4-[(E)-2-(Furan-2-yl)ethenyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (46c)



標記化合物 **46c** は 2-formylfuran **25j** を用いて、**20a** と同様の合成方法により淡黄色油状物質として得た (82% yield, *E/Z* = >99/1)。 $[\alpha]_D^{20} = -44$ (*c* 0.20, CH₃OH); ¹H NMR

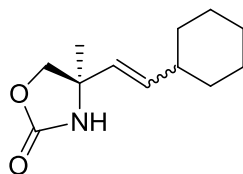
(500 MHz, CDCl₃) δ 1.52 (s, 3H), 4.12 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.24 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.96 (s, 1H), 6.16 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 6.28 (d, 1H, $J = 3.4$ Hz), 6.37 (dd, 1H, $J = 1.7, 3.4$ Hz), 6.40 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 7.34 (d, 1H, $J = 1.7$ Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 25.5, 58.5, 76.6, 109.6, 111.6, 118.5, 129.4, 142.6, 151.4, 159.0; IR (KBr) 3276, 1749, 1391, 1039, 739 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₀H₁₁NO₃ [M+H]⁺ 194.0817, found 194.0813.

(4R)-4-Methyl-4-(oct-1-en-1-yl)-1,3-oxazolidin-2-one (20k)



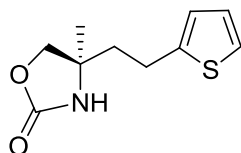
標記化合物 **20k** は *n*-heptanal **25k** を用いて、**20a** と同様の合成方法により無色油状物質として得た (62% yield, *E/Z* = 71/29)。[α]_D²⁰ = -30 (*c* 0.98, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.86 (t, 3H, $J = 7.6$ Hz), 1.19-1.38 (m, 8H), 1.41 (s, 2.1H), 1.46 (s, 0.9H), 1.99-2.07 (m, 2H), 4.06 (d, 0.7H, $J = 8.3$ Hz), 4.10 (d, 0.7H, $J = 8.3$ Hz), 4.21 (d, 0.3H, $J = 8.3$ Hz), 4.28 (d, 0.3H, $J = 8.3$ Hz), 5.00 (s, 0.7H), 5.15 (s, 0.3H), 5.41-5.50 (m, 1.4H), 5.64-5.70 (m, 0.6H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 14.1, 22.6, 25.5, 28.8, 29.0, 31.6, 32.1, 58.2, 76.7, 131.9, 133.8, 159.1; IR (KBr) 3261, 2925, 1746, 1387, 1281, 1038, 969, 770 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₂H₂₁NO₂ [M+H]⁺ 212.1651, found 212.1654.

(4R)-4-(2-Cyclohexylethenyl)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (20l)



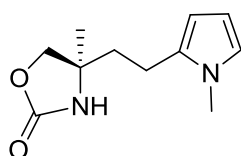
標記化合物 **20l** は *c*-hexanaldehyde **25l** を用いて、**20a** と同様の合成方法により無色油状物質として得た (62% yield, *E/Z* = 88/12)。[α]_D²⁰ = -24 (*c* 0.44, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 0.99-1.33 (m, 6H), 1.41 (s, 2.7H), 1.41 (s, 0.3H), 1.62-1.74 (m, 4H), 1.92-1.98 (m, 0.9H), 2.07-2.17 (s, 0.1H), 4.07 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.10 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.90 (brs, 0.9H), 5.10 (brs, 0.1H), 5.36-5.25 (m, 0.2H), 5.44 (d, 0.9H, $J = 15.6$ Hz), 5.62 (dd, 0.9H, $J = 6.8, 15.6$ Hz); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 25.6, 25.9, 26.1, 32.7, 40.2, 58.2, 76.7, 129.6, 137.1, 159.0; IR (KBr) 3210, 2922, 2849, 1742, 1397, 1286, 1038, 968, 771, 701 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₂H₁₉NO₂ [M+H]⁺ 210.1494, found 210.1496.

(4R)-4-Methyl-4-[2-(thiophen-2-yl)ethyl]-1,3-oxazolidin-2-one (30a)



(4R)-4-Methyl-4-[(*E*)-2-(thiophen-2-yl)ethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one **46a** (0.20 g, 0.95 mmol)の MeOH (10 ml)溶液に、10% Pd-C (50% wet, 20 mg)を加え、水素雰囲気下、室温で2時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:1 to 1:2)により精製して、標記化合物 **30a** (0.18 g, 92% yield, 99.0%ee)を淡黄色固体として得た。なお、得られた **30a** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OD-H (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 60:40, 流速: 0.50 ml/min, 温度: 25.0°C. 保持時間は(*S*)-**30a** と(*R*)-**30a** はそれぞれ 16.8分と 17.6分であった。mp: 82.8-83.5°C; $[\alpha]_D^{20} = +7.8$ (*c* 2.0, CHCl₃), +1.9 (*c* 0.10, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (s, 3H), 2.08-1.92 (m, 2H), 3.00-2.84 (m, 2H), 4.08 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 4.19 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 5.39 (brs, 1H), 6.81 (d, 1H, *J* = 3.6 Hz), 6.93 (dd, 1H, *J* = 5.2, 3.6 Hz), 7.15 (d, 1H, *J* = 5.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 24.6, 25.9, 42.3, 57.5, 75.5, 123.6, 124.6, 127.0, 147.6, 159.5; IR (KBr) 3283, 1770, 1399, 1244, 1043, 941, 846, 775, 706, 691 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₀H₁₄NO₂S [M+H]⁺ 212.0275, found 212.0741.

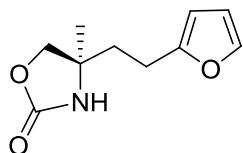
(4R)-4-Methyl-4-[2-(1-methyl-1H-pyrrol-2-yl)ethyl]-1,3-oxazolidin-2-one (30b)



標記化合物 **30b** は **46b** を出発原料とし、**30a** と同様の合成方法により黄色油状物質として得た(88% yield, 99.0%ee)。なお、得られた **30b** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OJ (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 70:30, 流速: 1.0 ml/min, 温度: 25.0°C. 保持時間は(*S*)-**30b** と(*R*)-**30b** はそれぞれ 12.5分と 15.5分であった。 $[\alpha]_D^{20} = +1.2$ (*c* 0.30, CH₃OH), ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.42 (s, 3H), 2.00-1.87 (m, 2H), 2.70-2.58 (m, 2H), 4.07 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.14 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 5.15 (brs, 1H), 5.88 (d, 1H, *J* = 3.2 Hz), 6.05 (dd, 1H, *J* = 3.2, 2.4 Hz), 6.58 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 20.8, 25.8, 33.6, 38.9, 57.5, 75.7, 105.7, 106.8, 121.9, 131.0, 158.8; IR (KBr) 3289, 3103, 2977, 2938,

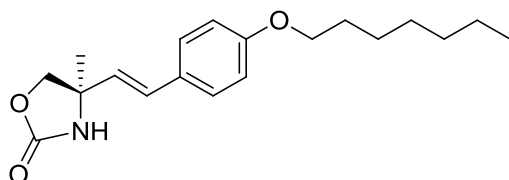
1759, 1713, 1495, 1397, 1381, 1309, 1281, 1231, 1032, 945, 928, 776, 718, 706, 656 cm^{-1} ;
HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 209.1290, found 209.1291.

(4R)-4-[2-(Furan-2-yl)ethyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (30c)



標記化合物 **30c** は **46c** を出発原料とし、**20a** と同様の合成方法により黄色油状物質として得た(78% yield, 99.0% ee)。なお、得られた **30c** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL AD (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 85:15, 流速: 1.0 ml/min, 温度: 25.0°C. 保持時間は(**S**)-**30c** と(**R**)-**30c** はそれぞれ 13.1 分と 15.4 分であった。 $[\alpha]_D^{20} = +2.2$ (c 0.11, CHCl_3); ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.38 (s, 3H), 1.68-1.61 (m, 2H), 1.98-1.94 (m, 2H), 2.72 (t, 2H, $J = 8.0$ Hz), 4.04 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 4.11 (d, 1H, $J = 8.4$ Hz), 5.92 (brs, 1H), 6.03 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz), 6.29 (d, 1H, $J = 2.6$ Hz), 7.31 (brs, 1H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 22.8, 25.6, 38.4, 57.4, 75.5, 105.5, 110.4, 141.3, 154.0, 159.0; IR (KBr) 3450, 2975, 2928, 2250, 1755, 1599, 1508, 1400, 1381, 1147, 1045, 1010 cm^{-1} ; HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 196.0974, found 196.0967.

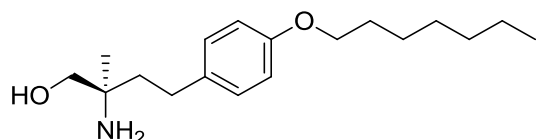
(4R)-4-[(E)-2-[4-(Heptyloxy)phenyl]vinyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (28a)



窒素雰囲気下、ホスホニウム塩 **24b** (0.20 g, 0.40 mmol)の THF(5.0 ml)溶液を -78°C に冷却し、*n*-butyllithium (2.7 M in hexane, 0.29 ml, 0.77 mmol)をゆっくりと滴下し、同温で 30 分間攪拌した。反応液に 4-heptoxybenzaldehyde **25m** (44 mg, 0.20 mmol)を加えた後、徐々に昇温し、室温で 2 時間攪拌した。その後、飽和 NH_4Cl 水溶液(10 ml)を加え、AcOEt (10 ml x 2)で抽出した。有機層を水(10 ml)と飽和食塩水(10 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:1 to 1:2)により精製して、標記化合物 **28a** (49 mg, 77%)を淡黄色固体として得た。mp: 70.1-70.7°C; $[\alpha]_D^{20} = -45$ (c 0.14, CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.87 (t, 3H, $J = 7.8$ Hz), 1.23-1.36 (m, 6H), 1.39-1.45 (m, 2H), 1.54 (s, 3H), 1.72-1.79 (m, 2H), 3.93 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 4.15 (d, 1H, J

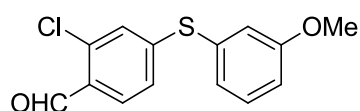
= 8.8 Hz), 4.21 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 5.02 (brs, 1H), 6.06 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 6.52 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 6.83 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz), 7.27 (d, 2H, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 14.1, 22.6, 25.6, 26.0, 29.1, 29.3, 31.8, 58.6, 68.1, 76.7, 114.7, 127.9, 128.2, 128.7, 129.7, 159.1, 159.4; IR (KBr) 3268, 2929, 2857, 1776, 1607, 1513, 1252, 1175, 1044 cm^{-1} ; HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{28}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 318.2069, found 318.2068.

(2R)-2-Amino-4-[4-(heptyloxy)phenyl]-2-methylbutan-1-ol (28)



(4R)-4- $\{(E)\text{-}2\text{-}[4\text{-}(\text{Heptyloxy})\text{phenyl}]\text{vinyl}\}$ -4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one **28a** (30 mg, 0.10 mmol)の MeOH (5.0 ml)溶液に、10% Pd-C (50% wet, 10 mg)を加え、水素雰囲気下、室温で2時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣を THF (2.0 ml)と MeOH (1.0 ml)で希釈し、5規定 KOH 水溶液(1.0 ml)を加え、加熱還流下、18時間攪拌した。室温まで冷却した後、水(10 ml)を加え、 CH_2Cl_2 (10 ml x 2)で抽出した。有機層を水(10 ml)と飽和食塩水(10 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、標記化合物 **28** (25 mg, 90%)を無色油状物質として得た。 $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -2.4$ (c 0.92, CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 0.86 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.10 (s, 3H), 1.22-1.77 (m, 12H), 2.56 (t, 2H, $J = 8.5$ Hz), 3.29 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 3.34 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 3.90 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 6.80 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 7.07 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 14.1, 22.6, 24.5, 26.0, 29.1, 29.3, 29.4, 31.8, 42.2, 53.0, 68.1, 70.3, 114.6, 129.1, 134.1, 157.4; IR (KBr) 3147, 2923, 2855, 2737, 1740, 1613, 1513, 1276, 1244, 1060, 825; MS(ESI) m/z : 294 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{31}\text{NO}_2$: C, 73.67; H, 10.65; N, 4.77. Found: C, 73.37; H, 10.60; N, 4.64.

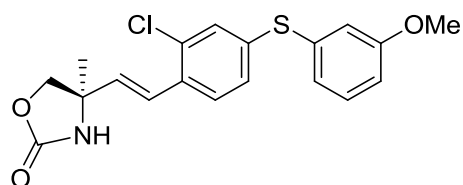
2-Chloro-4-[(3-methoxyphenyl)sulfanyl]benzaldehyde (25n)



3-Methoxybenzenethiol (1.4 g, 10 mmol)と 2-chloro-4-fluorobenzaldehyde (1.6 g, 10 mmol)の DMF (10 ml)溶液に potassium carbonate (2.1 g, 15 mmol)を加え、 45°C で30分間攪拌した。その後、反応液を 0°C に冷却し、水(25 ml)を加えた。AcOEt (30 ml x 2)で抽出し、有機層を水(30 ml)と飽和食塩水(30 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 5:1 to 1:1)により精製して、標記化合物 **25n** (2.5 g, 91%)を

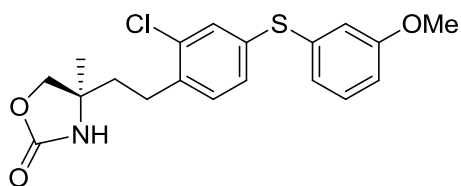
無色固体として得た。mp: 84.2-84.3°C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.80 (s, 3H), 6.97 (m, 1H), 7.10-7.02 (m, 4H), 7.34 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.74 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 10.33 (s, 1H); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 55.5, 115.7, 119.7, 125.3, 126.8, 127.6, 129.4, 129.6, 130.8, 131.1, 138.5, 148.6, 160.5, 188.8; IR (KBr) 3076, 2874, 1677, 1579, 1481, 1381, 1250, 1212, 1043, 853, 797, 691 cm^{-1} ; HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_2\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 279.0247, found 279.0251; Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{ClO}_2\text{S}$: C, 60.32; H, 3.98; Cl, 12.72; S, 11.50. Found: C, 60.19; H, 4.12; Cl, 12.55; S, 11.54.

(4R)-4-[(E)-2-{2-Chloro-4-[(3-methoxyphenyl)sulfanyl]phenyl}ethenyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (29a)



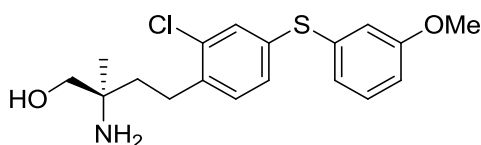
窒素雰囲気下、ホスホニウム塩 **24b** (0.50 g, 1.0 mmol)の THF(5.0 ml)溶液を -78°C に冷却し、*n*-butyllithium (1.9 M in hexane, 1.0 ml, 2.0 mmol)をゆっくりと滴下し、同温で 30 分間攪拌した。反応液に 2-chloro-4-[(3-methoxyphenyl)sulfanyl]benzaldehyde **25n** (0.14 g, 0.50 mmol)を加えた後、徐々に昇温し、室温で 2 時間攪拌した。その後、飽和 NH_4Cl 水溶液(10 ml)を加え、AcOEt (10 ml x 2)で抽出した。有機層を水(10 ml)と飽和食塩水(10 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 4:1 to 1:2)により精製して、標記化合物 **29a** (0.30 g, 80%)を淡黄色油状物質として得た。 $[\alpha]_D^{20} = -39$ (c 0.45, CH_3OH); ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 1.58 (s, 3H), 3.37 (s, 3H), 4.18 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 4.23 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 5.03 (s, 1H), 6.17 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 6.85 (m, 1H), 6.92-6.90 (m, 2H), 6.92 (d, 1H, $J = 16.1$ Hz), 7.11 (m, 1H), 7.26-7.23 (m, 2H), 7.37 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz); ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 25.4, 55.4, 58.7, 76.3, 114.0, 117.4, 124.5, 126.1, 127.3, 128.3, 130.3, 130.4, 132.2, 133.9, 134.0, 134.8, 138.3, 158.8, 160.3; IR (KBr) 3258, 1744, 1586, 1471, 1376, 1282, 1246, 1037, 969, 858, 770, 688 cm^{-1} ; HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{SCl}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 376.0774, found 376.0769.

(4R)-4-(2-{2-Chloro-4-[(3-methoxyphenyl)sulfanyl]phenyl}ethyl)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (29b)



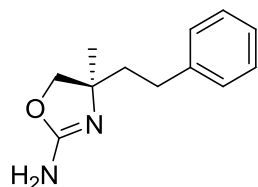
(4R)-4-[(E)-2-{2-Chloro-4-[(3-methoxyphenyl)sulfanyl]phenyl}ethenyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one **29a** (0.10 g, 0.26 mmol)の AcOEt (10 ml)溶液に、10% Pd-C (50% wet, 0.10 g)を加え、水素雰囲気下、室温で6時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:1 to 1:2)により精製して、標記化合物 **29b** (79 mg, 80%)を淡黄色油状物質として得た。 $[\alpha]_D^{20} = +1.5$ (c 0.76, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.40 (s, 3H), 1.86-1.80 (m, 2H), 2.77-2.65 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 4.09 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz), 4.25 (d, 1H, $J = 7.1$ Hz), 5.05 (s, 1H), 6.80 (m, 1H), 6.86 (m, 1H), 6.91 (m, 1H), 7.13-7.09 (m, 2H), 7.21 (m, 1H), 7.28 (m, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 26.0, 28.1, 40.4, 55.4, 57.7, 75.4, 113.4, 116.8, 124.0, 129.4, 130.2, 130.8, 131.3, 134.3, 135.7, 135.8, 137.1, 159.0, 160.2; IR (KBr) 3262, 1747, 1589, 1475, 1283, 1230, 1040, 772 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₉H₂₁NO₃SCl [M+H]⁺ 378.0931; found 378.0926.

(2R)-2-Amino-4-{2-chloro-4-[(3-methoxyphenyl)sulfanyl]phenyl}-2-methyl-butanol (29)



(4R)-4-(2-{2-Chloro-4-[(3-methoxyphenyl)sulfanyl]phenyl}ethyl)-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one **29b** (20 mg, 60 μ mol)を THF (1.0 ml)と MeOH(1.0 ml)に溶解させ、5規定 KOH 水溶液(0.50 ml)を加え、加熱還流下、12時間攪拌した。室温まで冷却した後、水(10 ml)を加え、CH₂Cl₂ (10 ml x 2)で抽出した。有機層を水(10 ml)と飽和食塩水(10 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、標記化合物 **29** (16 mg, 91%)を無色油状物質として得た。 $[\alpha]_D^{20} = -2.0$ (c 0.53, CHCl₃), -3.5 (c 0.19, CH₃OH); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.12 (s, 3H), 1.67-1.54 (m, 2H), 2.76-2.66 (m, 2H), 3.32 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 3.37 (d, 1H, $J = 10.3$ Hz), 3.75 (s, 3H), 6.78 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 6.85 (m, 1H), 6.88 (m, 1H), 7.15-7.13 (m, 2H), 7.20 (t, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.30 (s, 1H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 24.3, 27.9, 40.1, 53.0, 55.3, 70.3, 113.2, 116.4, 123.4, 129.7, 130.8, 131.6, 134.4, 134.7, 136.3, 139.0, 160.1; IR (KBr) 2931, 1747, 1587, 1473, 1246, 1229, 1039, 853, 772, 686 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₈H₂₃NO₂SCl [M+H]⁺ 352.1138, found 352.1148.

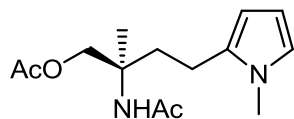
(4R)-4-Methyl-4-(2-phenylethyl)-4,5-dihydro-1,3-oxazol-2-amine (31)



(4R)-4-Methyl-4-[(*E*)-2-phenylethenyl]-1,3-oxazolidin-2-one **20a** (0.10 g, 0.26 mmol) の AcOEt (10 ml) 溶液に、10% Pd-C (50% wet, 0.10 g) を加え、水素雰囲気下、室温で 6 時間攪拌した。反応液をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣を THF (1.0 ml) と MeOH (1.0 ml) で希釈し、5 規定 KOH 水溶液 (0.50 ml) を加え、加熱還流下、12 時間攪拌した。室温まで冷却した後、水 (10 ml) を加え、CH₂Cl₂ (10 ml x 2) で抽出した。有機層を水 (10 ml) と飽和食塩水 (10 ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、淡黄色油状物質を得た。得られた残渣を THF (8.0 ml) で希釈し、0°C に冷却した後、窒素雰囲気下、potassium carbonate (62 mg, 0.46 mmol) と cyanogen bromide (54 mg, 0.51 mmol) を加えた。室温で 6 時間攪拌した後、反応液に水 (10 ml) を加え、AcOEt (10 ml x 2) で抽出した。有機層を水 (10 ml) と飽和食塩水 (10 ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (AcOEt:MeOH = 1:0 to 5:1) により精製して、標記化合物 **31** (69 mg, 69%) を淡黄色固体として得た。mp: 98.9-103.8°C; $[\alpha]_D^{20} = +6.5$ (*c* 0.74, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1.30 (s, 3H), 1.90-1.75 (m, 2H), 2.69-2.58 (m, 2H), 3.28 (brs, 2H), 3.94 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 4.09 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.28-7.25 (m, 5H); ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 27.3, 30.7, 43.6, 67.8, 78.1, 125.8, 128.3, 128.4, 142.4, 159.3; IR (KBr) 3432, 2968, 2211, 1702, 1671, 1410, 1218, 1006, 756, 705, 501 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₁₂H₁₇N₂O [M+H]⁺ 205.1341, found 205.1348.

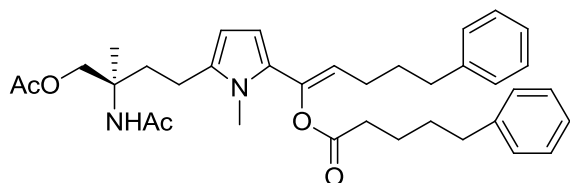
第 4 章に関する実験

(2R)-1-Acetoxy-2-acetylamino-2-methyl-4-(1-methylpyrrol-2-yl)butane (92)



(2R)-2-Amino-2-methyl-4-(1-methylpyrrol-2-yl)butan-1-ol 1/2 D-(-)-tartrate **16b** (4.0 g, 16 mmol)を CH₂Cl₂ (50 ml)および水(50 ml)の混合液に懸濁し、NaOH 水溶液(NaOH 3.2 g を水 13 ml に溶解)を加え、室温で 20 分間攪拌した。反応液を CH₂Cl₂ (50 ml x 2)で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣を CH₂Cl₂ (78 ml)に溶解し、triethylamine (22 ml, 0.16 mol)、acetic anhydride (7.3 ml, 77 mmol)、および 4-dimethylaminopyridine (0.19 g, 1.6 mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した後、MeOH (10 ml)を加えて反応を止め、減圧下溶媒を留去した。残渣に水を加えて、AcOEt(100 ml x 2)で抽出し、有機層を水(100 ml)、飽和重曹水(100 ml)および飽和食塩水(100 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 1:1 to 0:1)により精製して、標記化合物 **92** (4.2 g, 100%)を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.38 (s, 3H), 1.97-1.89 (m, 4H), 2.09 (s, 3H), 2.26-2.19 (m, 1H), 2.60-2.51 (m, 2H), 4.20 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 4.33 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz), 5.39 (brs, 1H), 5.88 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 6.54 (t, 1H, *J* = 2.4 Hz); MS (FAB) *m/z*: 267 (M+H)⁺.

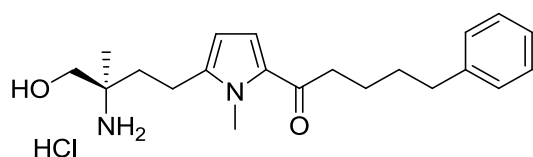
(2R)-1-Acetoxy-2-acethylamino-2-methyl-4-{1-methyl-[5-phenyl-1-(5-phenyl-pentanoyloxy)pent-1-enyl]pyrrol-2-yl}butane (94)



(2R)-1-Acetoxy-2-acetyl-amino-2-methyl-4-(1-methylpyrrol-2-yl)butane **92** (4.2 g, 15 mmol)を toluene (100 ml)に溶解し、4-dimethylaminopyridine (9.4 g, 77 mmol)および 5-phenylvaleroyl chloride **93** (7.9 g, 40 mmol)を toluene (50 ml)に溶解した溶液を加え、110°C で 48 時間攪拌した。室温に戻し、反応液に水(100 ml)を加えて AcOEt (100 ml x 2)で抽出し、有機層を水(100 ml)および飽和食塩水(100 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:2 to 2:1)により精製して、標記化合物 **94** (4.0 g, 45%)を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1.36 (s, 3H), 1.61-1.48 (m, 6H),

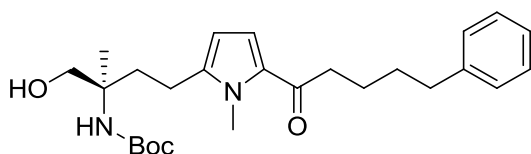
2.04-1.86 (m, 6H), 2.10 (s, 3H), 2.34-2.26 (m, 8H), 2.67-2.39 (m, 8H), 3.83 (s, 3H), 4.11 (t, 1H, $J = 8.1$ Hz), 4.15 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz), 4.31 (d, 1H, $J = 11.0$ Hz), 5.41 (brs, 1H), 5.97 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz), 6.96 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz), 7.17-7.11 (m, 6H), 7.26-7.23 (m, 4H); IR (CHCl₃) 3443, 2938, 2862, 1733, 1681, 1634, 1487, 1454, 1374, 1249, 1044 cm⁻¹; MS (FAB) m/z : 587 (M+H)⁺.

(2R)-2-amino-2-methyl-4-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]butan-1-ol hydrochloride (32)



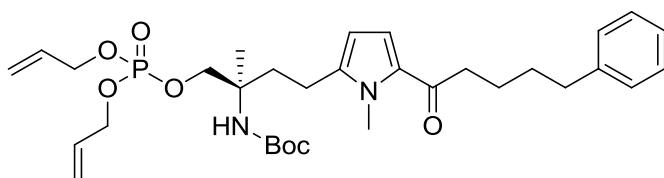
(2R)-1-Acetoxy-2-acethylamino-2-methyl-4-{1-methyl-[5-phenyl-1-(5-phenyl-pentanoyloxy)pent-1-enyl]pyrrol-2-yl}butane **94** (4.0 g, 6.9 mmol)を THF (14 ml)と MeOH (14 ml)との混合液に溶解し、水(14 ml)および lithium hydroxide monohydrate (2.9 g, 69 mmol)を加え、50°Cで4時間攪拌した。冷却後、反応液に水(50 ml)を加え、CH₂Cl₂ (50 ml x 2)で抽出し、有機層を飽和食塩水(50 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣を塩基性シリカゲル(NHタイプ)クロマトグラフィー(CH₂Cl₂:MeOH = 100:1)により精製して(2R)-2-amino-2-methyl-4-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]butan-1-ol (2.1 g)を黄色油状物質として得た。得られた粗生成物を MeOH (31 ml)に溶解し、4規定 HCl-dioxane (1.5 ml, 6.2 mmol)を加えて、室温で10分間攪拌した。減圧下濃縮し、AcOEt(10 ml)を加えて析出した結晶をろ取し、AcOEt(10 ml x 2)で洗浄し、減圧下乾燥して、標記化合物 **32** (2.1 g, 79%)を黄色固体として得た。 mp: 130.0-131.0°C; $[\alpha]_D^{27} = -4.8$ (c 1.0, CH₃OH); ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 1.36 (s, 3H), 1.70-1.64 (m, 4H), 1.90 (ddd, 1H, $J = 13.8, 11.5, 6.3$ Hz), 2.02 (ddd, 1H, $J = 13.8, 9.4, 7.6$ Hz), 2.63 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.78-2.67 (m, 4H), 3.55 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz), 3.65 (d, 1H, $J = 11.4$ Hz), 3.86 (s, 3H), 6.03 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz), 7.05 (d, 1H, $J = 4.2$ Hz), 7.17-7.11 (m, 3H), 7.25-7.21 (m, 2H); IR (KBr) 3215, 2937, 2883, 2691, 2571, 1646, 1525, 1482, 1457, 1380, 1294, 1228, 1182, 1055, 998, 913, 770, 751, 700 cm⁻¹; MS (FAB) m/z : 343 (M+H)⁺; Anal. Calcd for C₁₈H₃₁NO₂-HCl: C, 66.56; H, 8.25; N, 7.39; Cl, 9.36. Found: C, 66.51; H, 8.20; N, 7.47; Cl, 9.08.

(2R)-2-*t*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-4-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]butan-1-ol (95)



(2R)-2-Amino-2-methyl-4-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]butan-1-ol hydrochloride **32** (1.5 g, 3.9 mmol)の CH_2Cl_2 (38 ml)溶液に、di-*tert*-butyldicarbonate (1.0 g, 4.6 mmol)と triethylamine (1.6 ml, 12 mmol)を加え、室温で4時間攪拌した。反応液に水(50 ml)を加え、 CH_2Cl_2 (50 ml x 2)で抽出した。有機層を水(50 ml)および飽和食塩水(50 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:2)により精製して、標記化合物 **95** (1.7 g, 99%)を淡黄色油状物質として得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.21 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.79-1.64 (m, 4H), 1.96-1.89 (m, 1H), 2.13-2.04 (m, 1H), 2.55 (ddd, 1H, $J = 15.4, 12.4, 5.1$ Hz), 2.70-2.62 (m, 3H), 2.75 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 3.68 (d, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.87 (s, 3H), 3.98 (brs, 1H), 4.63 (brs, 1H), 5.95 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz), 6.90 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz), 7.18-7.14 (m, 3H), 7.28-7.24 (m, 2H); MS (FAB) m/z : 443 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

(2R)-2-*t*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-9-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]-1-butyl diallyl phosphate (96)



(2R)-2-*t*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-4-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]butan-1-ol **95** (1.7 g, 3.8 mmol)の CH_2Cl_2 (19 ml)溶液に、氷冷下、1*H*-tetrazole (1.8 g, 26 mmol)と diallyl diisopropylphosphoramidite ((AllylO) $_2$ PN*i*-Pr $_2$) (2.0 ml, 7.6 mmol)を加えた後、室温まで昇温し、2時間攪拌した。反応液に、氷冷下、*t*-BuOOH (5-6 M *n*-decane solution, 2.3 ml, 12 mmol)を加え、同温度で15分間攪拌した。反応液に飽和 Na_2SO_3 水溶液(20 ml)を加え反応を停止させた後、 CH_2Cl_2 (50 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和重曹水(50 ml)および飽和食塩水(50 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:2)により精製して、標記化合物 **96** (1.6 g, 68%)を淡黄色油状物質として得た。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.26 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 1.79-1.64 (m, 4H), 1.90-1.81 (m, 1H), 2.22-2.12 (m, 1H), 2.58 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 2.64 (t, 2H, $J = 8.1$ Hz), 2.74 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 3.86 (s, 3H), 4.01 (dd, 1H, $J = 9.5, 5.9$ Hz), 4.21 (dd, 1H, $J = 9.5,$

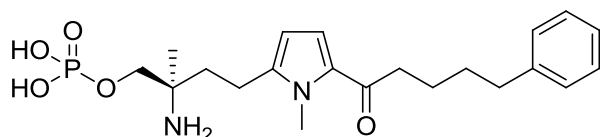
5.1 Hz), 4.60-4.52 (m, 4H), 4.62 (brs, 1H), 5.39-5.29 (m, 4H), 5.99-5.89 (m, 3H), 6.89 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz), 7.18-7.14 (m, 3H), 7.28-7.24 (m, 2H); MS (FAB) m/z : 603 (M+H)⁺.

Mono (2R)-2-amino-2-methyl-4-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]-1-butyl phosphate (32-P)

from

(2R)-2-*t*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-9-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]-1-butyl diallyl phosphate (96)

:typical chemical synthetic procedure



(2R)-2-*t*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-9-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]-1-butyl diallyl phosphate **96** (1.6 g, 2.6 mmol)、triphenylphosphine (0.14 g, 0.54 mmol)と tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (0.15 g, 0.13 mmol)を acetonitrile (26 ml)に懸濁させ、窒素雰囲気下、pyrrolidine (1.1 ml, 13 mmol)を加え、室温で 24 時間攪拌した。反応液を減圧下濃縮し、得られた残渣に 1 規定 HCl 水溶液 (15 ml)を加え、CH₂Cl₂ (50 ml x 2)で抽出した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、粗精の標記化合物(1.5 g)を得た。得られた粗生成物に CH₂Cl₂ (26 ml)を加え、氷冷下、trifluoroacetic acid (TFA) (8.6 ml)を加え、攪拌した。室温まで昇温し、さらに 2 時間攪拌した後、減圧下溶媒を留去し、得られた残渣に EtOH (10 ml)を加えた。析出した結晶をろ過した後、得られた結晶を MeOH (200 ml)と水(67 ml)の混合溶媒に溶解させ、その溶液に charcoal を加えた。室温で 5 分間攪拌した後、charcoal をセライトろ過し、ろ液を減圧下濃縮した。残渣に EtOH (10 ml)を加え、室温に放置することで析出した結晶をろ過し、EtOH (10 ml)洗浄を行い、高純度の標記化合物 **32-P** (0.56 g, 51%)を無色針状結晶として得た。[α]²⁵_D = +1.5 (*c* 0.10, CH₃CO₂H); ¹H NMR (400 MHz, CD₃CO₂D) δ 1.46 (s, 3H), 1.75-1.63 (m, 4H), 2.20-2.01 (m, 2H), 2.63 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 2.82-2.71 (m, 4H), 3.87 (s, 3H), 4.17 (d, 2H, $J = 10.3$ Hz), 6.04 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz), 7.07 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz), 7.17-7.11 (m, 3H), 7.25-7.22 (m, 2H); IR (KBr) 3429, 2934, 2857, 2717, 2603, 1639, 1557, 1480, 1455, 1378, 1182, 1056, 1041, 946, 915, 821, 748, 699, 580, 511 cm⁻¹; MS (FAB) m/z : 421 (M-H)⁻; Anal. Calcd for C₂₁H₃₂N₂O₅P: C, 59.70; H, 7.40; N, 7.33. Found: C, 59.37; H, 7.41; N, 6.64; P, 6.84.

:from

(2R)-2-amino-2-methyl-4-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]butan-1-ol hydrochloride (32): typical biotransformation procedure

<液体培養法>

マルト・エクストラクト(ベクトン・ディッキンソン社製) 0.10%、コーン・スチープ・リカー(日食製) 0.30%、グルコース 1.0%、ポリペプトン(日本製薬社製) 0.20%、イースト・エクストラクト(ディフコ社製) 0.10%、NaH₂PO₄ 0.10%、寒天 0.30%からなる培養培地(以下、「種培養培地」という。) 80 ml を 121℃、20 分間加熱滅菌した。これに、シルシネラ・ムスカエ(*Circinella muscae*) NBRC4457 を一白金耳接種し、回転振とう培養機で 23℃、210 rpm で 2 日間培養し、これを種培養液とした。この培養液に 10 mg/ml の濃度で 0.010% formic acid/water 水溶液に溶解した (2R)-2-amino-2-methyl-4-[1-methyl-5-(5-phenylpentanoyl)pyrrol-2-yl]butan-1-ol hydrochloride **32** (40 mg, 0.11mmol)の溶液を 0.80 ml 添加し、再度回転振とう培養機で 23℃、210 rpm で 3 日間培養を行った。変換反応の進行は以下に示す条件にて HPLC でモニターした。Unison UK-C18 column (4.6φ x 75 mm), 0.1% formic acid/ acetonitrile = 70:30, flow rate: 0.80 ml/min. **32**、**32-P** の保持時間はそれぞれ、6.7 分、3.2 分であった。

反応終了後、培養液 0.40 l にアセトン(0.40 l)を加え、さらにリン酸(40 μl)を加えて抽出後、菌体を吸引濾過によって取り除き濾液(c.a. 0.80 l)を得た。この濾液に蒸留水(0.80 l)を加えた後、あらかじめ 0.10%リン酸水溶液で平衡化したダイヤイオン HP-20(40 ml:三菱化学(株))カラムに供与した。カラムを蒸留水 0.20 l、次いで 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0) 0.20 l で洗浄した後、10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0) : アセトン = 7 : 3 の混合溶媒 0.20 l で溶出し、さらに 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0) : アセトン = 1 : 1 の混合溶媒 0.20 ml で溶出した。このようにして得られた溶出液を合わせた後に濃縮し、次いで凍結乾燥を行うことで粗生成物として標記化合物 **32-P** (68 mg)を白色固体として得た。得られた固体を 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0) : アセトニトリル = 1 : 1 の混合溶媒 10 ml に溶解し、あらかじめ 10 mM ギ酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0) : アセトニトリル = 7 : 3 の混合溶媒で平衡化した HPLC カラム(Develosil ODS UG-5 : 20φ x 150 mm)に供与し、同混合溶媒で流速 10.0 ml/min で溶出した。目的物質の紫外吸収 280 nm を検出し、保持時間 8.6 分に現れるピークを分取した。分取液をまとめ、減圧濃縮して得られた懸濁液 20 ml を凍結乾燥し、高純度の標記化合物 **32-P** (35 mg)を無色固体として得た。

<休止菌体法>

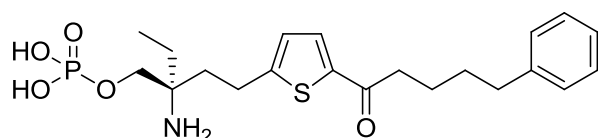
種培養培地 30 ml を含有する 100 ml 容三角フラスコ 2 本に、シルシネラ・ムスカ

エ (*Circinella muscae*) NBRC4457 を一白金耳接種し、回転振とう培養機で 23°C、210 rpm で 2 日間培養した。得られた培養液から遠心分離処理により菌体を回収し、60 ml の滅菌蒸留水で菌体を懸濁した後、6 本の 15 ml 容コニカルチューブに 10 ml ずつ分注し、遠心分離処理により菌体を回収した。それぞれのコニカルチューブに、pH 7 の 50 mM リン酸バッファーを 5 ml 添加して菌体を懸濁し、遠心分離により菌体を回収した後、同バッファー 5 ml に菌体を懸濁し、休止菌体反応液とした。このようにして得られた休止菌体反応液を 1 ml とり、24 ウェル培養プレート(住友ベークライト製)のそれぞれのウェルに移し、10 mg/ml の濃度で 0.01%ギ酸水溶液に溶解した **32** の溶液を 10 μ l 添加して、24 ウェルプレート用回転振とう培養機(丸菱バイオエンジニア製)で 23°C、350 rpm で 2 日間反応を行った。反応後の休止菌体反応液に等量のメタノールを添加して懸濁した後、4500 rpm、10 分間の遠心分離処理を行い、その上清を休止菌体反応液抽出物とした。得られた抽出物は上記方法に従って精製を行い、リン酸エステル体 **32-P** を得た。

<凍結乾燥菌体法>

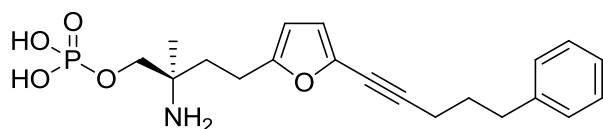
休止菌体調製時と同様にして、シルシネラ・ムスカエ (*Circinella muscae*) NBRC4457 の培養を行った。得られた培養液から遠心分離処理により菌体を回収し、pH 7 の 50 mM リン酸バッファー(2 回)、イオン交換水で菌体を洗浄した。回収した菌体にドライアイスアセトンよりを行い、凍結乾燥菌体とした。その後の反応は、休止菌体法と同様にして行った。

Mono (2*R*)-2-amino-2-ethyl-4-[5-(5-phenylpentanoyl)thiophen-2-yl]-1-butyl phosphate (101-P)



標記化合物 **101-P** は化合物 **101** を出発原料とし、事前に凍結乾燥処理を行ったシルシネラ・ムスカエ (*Circinella muscae*) NBRC4457 を用いて、**32-P** と同様の合成方法にて淡黄色固体として 18%の収率で得た。なお、**101-P** の純度は下記に示す HPLC 分析により決定した。Unison UK-C8 column (4.6 ϕ x 75 mm), 0.1% formic acid water:acetonitrile = 65:35, 流速: 0.80 ml/min. **101-P** の保持時間は 4.2 分であった。¹H NMR (400MHz, CD₃CO₂D) δ 1.05 (t, 3H, J = 7.3Hz), 1.65-1.80 (m, 4H), 1.92 (q, 2H, J = 7.3Hz), 2.16-2.21 (m, 2H), 2.64 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 2.93 (t, 2H, J = 7.3 Hz), 3.00-3.05 (m, 2H), 4.26 (d, 2H, J = 7.3 Hz), 6.99 (d, 1H, J = 3.7 Hz), 7.12-7.19 (m, 3H), 7.22-7.27 (m, 2H), 7.67 (d, 1H, J = 3.7 Hz); MS (FAB) m/z : 438 (M-H)⁻.

Mono (2*R*)-2-amino-2-methyl-4-[5-(5-phenylpent-1-yn-1-yl)furan-2-yl]butyl phosphate (102-P)



標記化合物 **102-P** は化合物 **102** を出発原料とし、事前に凍結乾燥処理を行ったシルシネラ・ムスカエ (*Circinella muscae*) NBRC4457 を用いて、**32-P** と同様の合成方法にて淡黄色固体として 43% の収率で得た。なお、**102-P** の純度は下記に示す HPLC 分析により決定した。Unison UK-C8 column (4.6φ x 75 mm), 0.1% formic acid water:acetonitrile = 65:35, 流速: 0.80 ml/min. **102-P** の保持時間は 5.0 分であった。¹H NMR (400MHz, CD₃CO₂D) δ 1.41 (s, 3H), 1.95-1.84 (m, 2H), 2.43 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.72 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.84-2.70 (m, 2H), 4.11 (d, 2H, *J* = 9.5 Hz), 6.09 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 6.42 (d, 1H, *J* = 2.9 Hz), 7.31-7.13 (m, 5H); MS (FAB) *m/z*: 390 (M-H)⁺.

Biology

Efficacious in the adjuvant-induced arthritis model in rats

試験に使用する動物は、8 週齢雌性 Lewis ラットを用いた。1 群 5 匹のラットを用いた。まず、mycobacterium butyricum 加熱死菌体をメノウ乳鉢で微細化後、乾熱滅菌した流動パラフィンに 2 mg/ml になるよう懸濁し、超音波処理をしてアジュバントを調製した。調製したアジュバント 0.05 ml を対照群および被験化合物投与群のラットの右後肢足蹠皮内に注射することで、アジュバント関節炎の誘導を行った。なお、アジュバントを注射しない群として正常対照群を設けた。被験化合物を 0.5% トラガカント液に懸濁または溶解した後、調製した化合物をアジュバント注射日から 18 日間、1 日 1 回、5 ml/kg 経口投与した。また、対照群には 0.5% トラガカント液のみを同様に投与した。

投与開始後、11 日目と 18 日目に右後肢の体積を足体積測定装置で測定し、各群の腫脹体積の平均値を算出した後、次式により足蹠体積増加抑制率 (%) を算出し、各化合物の評価を行った。(式 1)

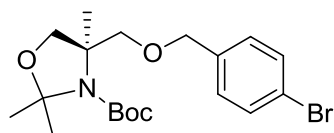
$$\text{足蹠体積増加抑制率(\%)} = (1 - (\text{「被験化合物投与群の足蹠体積」} - \text{「常対照群の足蹠体積」})) / (\text{「対照群の足蹠体積」} - \text{「正常対照群の足蹠体積」})) \times 100 \quad (\text{式 1})$$

Inhibitory activities against Host versus Graft Reaction in rats (HvGR)

第 2 章実験の部に記載した方法に準じて実施した。

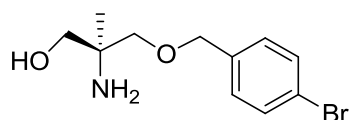
第 5 章に関する実験

tert-Butyl (4*R*)-4-[(4-bromophenyl)methoxymethyl]-2,2,4-trimethyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (**111**)



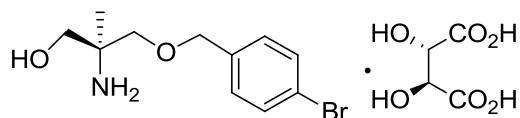
tert-Butyl (4*R*)-4-(hydroxymethyl)-2,2,4-trimethyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **56** (2.2 g, 8.8 mmol) の DMF 溶液 (50 ml) を 0°C に冷却し、sodium hydride (60%, 60 mg, 13 mmol) を加え、10 分間攪拌した。反応液に 4-bromobenzylbromide (3.3 g, 13 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。攪拌後、反応液を飽和 NH₄Cl 水溶液 (50 ml) に注ぎ、AcOEt (50 ml x 2) で抽出した。有機層を水 (30 ml)、飽和食塩水 (30 ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (hexane:AcOEt = 5:1 to 2:1) により精製して、標記化合物 **111** (3.6 g, 99%) を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.40-1.51 (m, 18H), 3.49 (dd, 1H, *J* = 14.1, 9.0 Hz), 3.61 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 3.72 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 4.08 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 4.39-4.51 (m, 2H), 7.16 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.45 (d, 2H, *J* = 7.4 Hz); IR (KBr) 2978, 2869, 1695, 1367, 1097, 1071, 804 cm⁻¹; MS(FAB) *m/z*: 414 (M+H)⁺.

(2*S*)-2-Amino-3-[(4-bromophenyl)methoxy]-2-methyl-propan-1-ol (**112**)



tert-Butyl (4*R*)-4-[(4-bromophenyl)methoxymethyl]-2,2,4-trimethyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **111** (3.6 g, 8.9 mmol) の CH₂Cl₂ 溶液 (60 ml) に、室温で TFA (30 ml) を加え、30 分間攪拌した後、反応液に水 (30 ml) を加え、5 時間攪拌した。その後、減圧下溶媒を留去し、得られた残渣を CH₂Cl₂ (50 ml) で希釈した後、4 規定 NaOH 水溶液を用いて、反応液を pH 14 にした。CH₂Cl₂ (50 ml x 2) で抽出後、有機層を水 (30 ml)、飽和食塩水 (30 ml) で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH = 1:0 to 5:1) により精製して、標記化合物 **112** (2.2 g, 88%) を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.02 (s, 3H), 3.29-3.42 (m, 4H), 4.43 (s, 2H), 7.13 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz), 7.42 (d, 2H, *J* = 8.6 Hz); IR (KBr) 2924, 1464, 1095, 805 cm⁻¹; MS(FAB) *m/z*: 274 (M+H)⁺.

(2S)-2-Amino-3-[(4-bromophenyl)methoxy]-2-methyl-propan-1-ol, D-(-)-tartaric acid (113)



(2S)-2-Amino-3-[(4-bromophenyl)methoxy]-2-methyl-propan-1-ol **112** (2.1 g, 7.8 mmol)を EtOH (20 ml)と水(4.0 ml)の混合溶媒に溶解した後、D-(-)-tartaric acid (1.1 g, 7.3 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。その後、Et₂Oを用いて減圧下溶媒を留去することで生成した固体をろ取り、粗生成物として標記化合物 **113** (2.1 g)を無色固体として得た。得られた **113** (2.1 g)に対し、水(8.0 ml)を用いた再結晶操作を行うことで、高純度の標記化合物 **113** (1.5 g, 50% yield, 99.0% ee)を白色針状結晶として得た。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.13 (s, 3H), 3.38-3.47 (m, 4H), 4.52 (s, 2H), 7.34 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.56 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz); IR (KBr) 3320, 2918, 1905, 1729, 1575, 1404, 1304, 1263, 1214, 1134, 803, 680, 484 cm⁻¹; Anal. Calcd for C₁₁H₁₆BrNO₂·C₄H₆O₆·H₂O: C, 40.74; H, 5.47; N, 3.17; Br, 18.07. Found: C, 40.48; H, 5.49; N, 3.30; Br, 18.16.

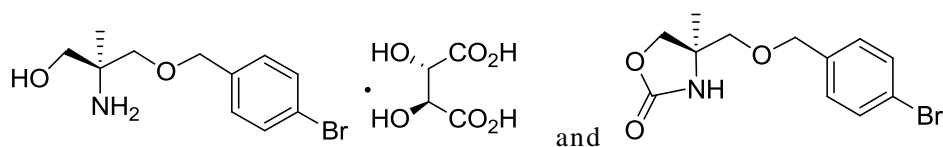
なお、化合物 **113** の光学純度は以下の操作により、化合物 **113** を(4R)-4-[(4-bromophenyl)methoxymethyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one **114** へと導いた後、HPLC測定を行い決定した。

A procedure of the determination of the enantio purity of

(2S)-2-amino-3-[(4-bromophenyl)methoxy]-2-methyl-propan-1-ol,

D-(-)-tartaric acid (113)

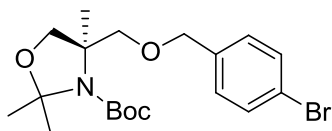
; synthesis of (4R)-4-[(4-bromophenyl)methoxymethyl]-4-methyl-1,3-oxazolidin-2-one (114)



化合物 **113** (10 mg, 0.024 mmol)に CH₂Cl₂ (3.0 ml)、1規定 NaOH 水溶液(0.20 ml)を加え、室温で30分間攪拌した。CH₂Cl₂ (5.0 ml x 2)で抽出した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去することで、(2S)-2-amino-3-[(4-bromophenyl)methoxy]-2-methyl-propan-1-ol, D-(-)-tartaric acid **113** のフリー体である(2S)-2-amino-3-[(4-bromophenyl)methoxy]-2-methyl-propan-1-ol **112** を無色油状物質として得た。得られた **112** を CH₂Cl₂ (1.0 ml)に溶解し、1,1'-carbonyldiimidazole (11 mg, 0.068 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂:MeOH = 20:1)

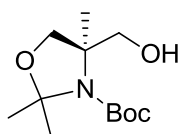
により精製して、標記化合物 **113** (6.5 mg, 90%) を無色固体物質として得た。得られた **113** の光学純度は以下に示す条件を用いた HPLC 分析により決定した。DAICEL CHIRALCEL OD-H (4.6φ x 250 mm), hexane:2-propanol = 70:30, 流速: 1.0 ml/min, 温度: 25.0°C. 保持時間は(S)- **113** と(R)- **113** はそれぞれ 6.0 分と 7.5 分であった。

tert*-Butyl (4*R*)-4-[(4-bromophenyl)methoxymethyl]-2,2,4-trimethyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (**111**) from **113*



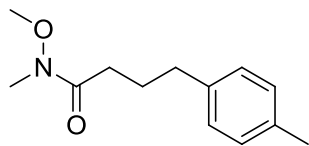
化合物 **113** (1.5 g, 3.9 mmol) に CH₂Cl₂ (30 ml)、1 規定 NaOH 水溶液(10 ml)を加え、室温で 30 分間攪拌した。CH₂Cl₂ (30 ml x 2)で抽出した後、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去することで、粗生成物の (2*S*)-2-amino-3-[(4-bromophenyl)methoxy]-2-methyl-propan-1-ol **112** を無色油状物質として得た。得られた **112** を CH₂Cl₂ (30 ml)で希釈し、室温で Boc₂O (0.90 g, 4.1 mmol) と triethylamine (0.70 ml, 4.8 mmol)を加え、2 時間攪拌した後、減圧下溶媒を留去した。得られた残渣を CH₂Cl₂ (50 ml)で希釈し、室温で 2,2-dimethoxypropane (5.0 ml, 34 mmol)と BF₃-OEt₂ (24 mg, 0.20 mmol)を加え、1 時間攪拌した。反応液に triethylamine (2.0 ml)を加え、減圧下溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 2:1)により精製して、標記化合物 **111** (1.4 g, 94%) を無色油状物質として得た。

tert*-Butyl (4*R*)-4-(hydroxymethyl)-2,2,4-trimethyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (**56**) from **111*



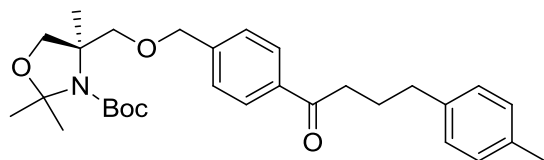
tert-Butyl (4*R*)-4-[(4-bromophenyl)methoxymethyl]-2,2,4-trimethyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **111** (5.0 g, 12 mmol) の EtOH (100 ml)溶液に potassium carbonate (2.5 g, 18 mmol)と 10% Pd-C (50% wet, 3.5 g)を加え、水素雰囲気下、室温で 24 時間攪拌した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 10:1 to 4:1)により精製して、標記化合物 **56** (3.0 g, 100%) を無色油状物質として得た。

***N*-Methoxy-*N*-methyl-4-(*p*-tolyl)butanamide (116)**



4-(*p*-Tolyl)butanoic acid (5.0 g, 28 mmol)の CH₂Cl₂ (0.17 l)溶液に *N,O*-dimethylhydroxylamine hydrochloride (3.3 g, 34 mmol)と 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (6.5 g, 34 mmol)を加え、室温で 10 分間攪拌した。反応液を 0°Cに冷却後、*N*-methylmorpholine (9.3 ml, 84 mmol)を滴下した。室温まで昇温し、2 時間攪拌した後、1 規定 HCl 水溶液(100 ml)を加えた。さらに水(200 ml)を加え、CH₂Cl₂ (100 ml x 2)で抽出した。有機層を水(70 ml)および飽和食塩水(70 ml)で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 3:1 to 2:1)により精製して、標記化合物 **116** (5.6 g, 46%)を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.94-1.87 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.43-2.33 (m, 2H), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.12 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 7.02 (s, 4H); MS(FAB) *m/z*: 212 (M+H)⁺.

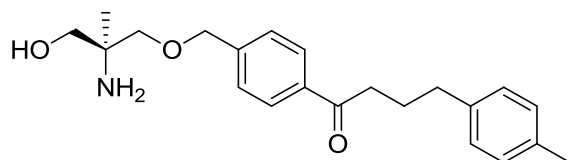
***tert*-Butyl (4*R*)-2,2,4-trimethyl-4-[(4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl)oxy]-methyl]-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (119a)**



窒素雰囲気下、*tert*-butyl (4*R*)-4-[(4-bromophenyl)methoxymethyl]-2,2,4-trimethyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **111** (1.0 g, 2.4 mmol)の THF (20 ml)溶液を -78°Cに冷却した後、*n*-BuLi (1.6 M hexane solution, 2.3 ml, 3.6 mmol)をゆっくりと滴下し、同温で 30 分間攪拌した。その後、反応液に *N*-methoxy-*N*-methyl-4-(*p*-tolyl)butanamide **116** (1.1 g, 4.8 mmol)の THF 溶液(5.0 ml)を滴下し、徐々に室温まで昇温させ、さらに 2 時間攪拌した。飽和 NH₄Cl 水溶液(15 ml)、水(50 ml)を加え、AcOEt (40 ml x 2)で抽出した。有機層を水(40 ml)および飽和食塩水(40 ml)で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 10:1 to 3:1)により精製して、標記化合物 **119a** (0.51 g, 46%)を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 1.61-1.32 (m, 18H), 2.05 (dt, 2H, *J* = 7.3, 7.3 Hz), 2.32 (s, 3H), 2.68 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.95 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.82-3.49 (m, 3H), 4.16-4.11 (m, 1H), 4.65-4.50 (m, 2H), 7.09 (s, 4H), 7.42-7.34 (m, 2H), 7.93-7.85 (m, 2H); IR (KBr) 2978, 2935, 1692, 1385, 1368, 1258, 1176, 1097, 1064 cm⁻¹; MS(FAB)

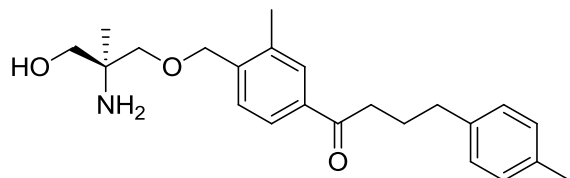
m/z : 496 (M+H)⁺.

1-(4-[(2S)-2-Amino-3-hydroxy-2-methylpropoxy]methyl)phenyl)-4-(4-methylphenyl)butan-1-one, hydrochloride (33a)



(4R)-2,2,4-Trimethyl-4-[(4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl)oxy]methyl)-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **119a** (3.6 g, 8.9 mmol)の CH₂Cl₂ 溶液(60 ml)に、室温で TFA (30 ml)を加え、30 分間攪拌した後、反応液に水(30 ml)を加え、5 時間攪拌した。その後、減圧下溶媒を留去し、得られた残渣を CH₂Cl₂ (50 ml)で希釈した後、4 規定 NaOH 水溶液を用いて、反応液を pH 14 にした。CH₂Cl₂ (50 ml x 2)で抽出後、有機層を水(30 ml)、飽和食塩水(30 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、化合物 **33a** のフリー体を黄色油状物質として得た。得られたフリー体を EtOH (60 ml)で希釈し、4 規定 HCl/dioxane 溶液(4.4 ml)を加え、室温で 1 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去して、生成した固体を Et₂O でろ取り、標記化合物 **33a** (2.2 g, 78%)を無色固体物質として得た。¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆) δ 1.18 (s, 3H), 1.89 (tt, 2H, *J* = 7.3, 7.3 Hz), 2.26 (s, 3H), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.02 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.57-3.42 (m, 4H), 4.63 (s, 2H), 4.66 (t, 1H, *J* = 5.1 Hz), 7.09 (s, 4H), 7.51 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 7.93 (d, 2H, *J* = 8.0 Hz), 8.02-7.79 (brs, 2H); IR (KBr) 3383, 3020, 2890, 1683, 1607, 1514, 1253, 1118, 979, 790 cm⁻¹; MS(FAB) m/z : 356 (M+H)⁺; Anal. Calcd for C₂₂H₂₉NO₃·HCl: C, 67.42; H, 7.72; N, 3.57; Cl, 9.05. Found: C, 66.92; H, 7.75; N, 3.73; Cl, 9.04.

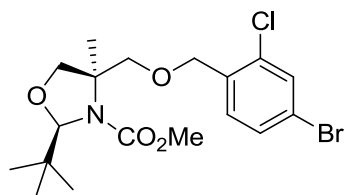
1-(4-[(2S)-2-Amino-3-hydroxy-2-methylpropoxy]methyl)-3-methylphenyl)-4-(4-methylphenyl)butan-1-one, hydrochloride (33b)



1-(4-[(2S)-2-Amino-3-hydroxy-2-methylpropoxy]methyl)-3-methylphenyl)-4-(4-methylphenyl)butan-1-one, hydrochloride **33b** は化合物 **119b** を出発原料とし、化合物 **33a** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。化合物 **33b** は全 4 工程、18% で得られた。¹H NMR (400MHz, CD₃OD) δ 1.27 (s, 3H), 1.90-1.98 (m, 2H), 2.25 (s, 3H),

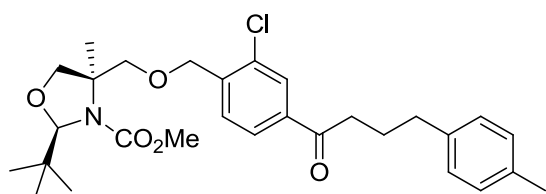
2.36 (s, 3H), 2.60 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.94 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 3.45-3.58 (m, 2H), 3.59-3.62 (m, 2H), 4.62 (s, 2H), 7.02 (brs, 4H), 7.43 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.68 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz); IR (KBr) 3387, 2944, 2558, 1680, 1606, 1513, 1257, 1101, 791 cm^{-1} ; HRMS (ESI): calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 370.2382, found 370.2395.

Methyl (2*R*,4*R*)-4-[(4-bromo-2-chloro-phenyl)methoxymethyl]-2-*tert*-butyl-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (115e)



Methyl (2*R*,4*R*)-2-*tert*-butyl-4-(hydroxymethyl)-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **26** (3.0 g, 13 mmol)の DMF 溶液(30 ml)を 0°C に冷却し、sodium hydride (60%, 0.60 g, 13 mmol) を加え、10 分間攪拌した。反応液に 4-bromo-3-chlorobenzylbromide (5.5 g, 20 mmol)を加え、室温で 2 時間攪拌した。攪拌後、反応液を飽和 NH_4Cl 水溶液(50 ml)に注ぎ、AcOEt (50 ml x 2)で抽出した。有機層を水(30 ml)、飽和食塩水(30 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(hexane:AcOEt = 1:0 to 4:1)により精製して、標記化合物 **115e** (3.6 g, 64%)を淡黄色油状物質として得た。 ^1H NMR (400MHz, CD_3Cl) δ 0.96 (s, 9H), 1.46 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.75 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 3.77 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 3.98-3.93 (m, 1H), 4.21 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.59 (s, 2H), 5.17 (s, 1H), 7.31 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.42 (dd, 1H, $J = 8.8, 1.5$ Hz), 7.55 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz); MS(FAB) m/z : 434 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

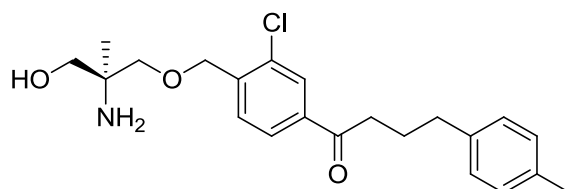
Methyl (2*R*,4*R*)-2-*tert*-butyl-4-[(2-chloro-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl]oxy)methyl]-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (117e)



窒素雰囲気下、methyl (2*R*,4*R*)-4-[(4-bromo-2-chloro-phenyl)methoxymethyl]-2-*tert*-butyl-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **115e** (2.3 g, 5.4 mmol)の THF (40 ml)溶液を、-78°C に冷却した後、*n*-BuLi (1.6 M hexane solution, 5.1 ml, 8.1 mmol)をゆっくりと滴下し、同温で 30 分間攪拌した。その後、反応液に *N*-methoxy-*N*-methyl-4-(*p*-tolyl)butanamide**116** (2.4 g, 11 mmol)の THF 溶液(5.0 ml)を滴下し、徐々に室温ま

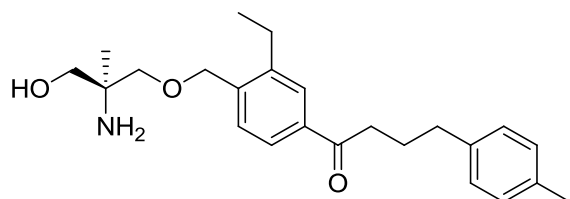
で昇温させ、さらに 2 時間攪拌した。飽和 NH₄Cl 水溶液 (50 ml)、水 (50 ml) を加え、AcOEt (80 ml x 2) で抽出した。有機層を水 (40 ml) および飽和食塩水 (40 ml) で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (hexane:AcOEt = 10:1 to 3:1) により精製して、標記化合物 **117e** (1.3 g, 46%) を淡黄色油状物質として得た。¹H NMR (400MHz, CD₃Cl) δ 0.97 (s, 9H), 1.49 (s, 3H), 2.12-2.07 (m, 2H), 2.36 (s, 3H), 2.71 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.96 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.72 (s, 3H), 3.83-3.77 (m, 2H), 4.03-3.97 (m, 1H), 4.26-4.23 (m, 1H), 4.68 (s, 2H), 5.19 (s, 1H), 7.13 (s, 4H), 7.55 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.83 (dd, 1H, *J* = 7.8, 1.5 Hz), 7.91 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz); MS(FAB) *m/z*: 516 (M+H)⁺.

1-(4-[(2*S*)-2-Amino-3-hydroxy-2-methylpropoxy]methyl)-3-chlorophenyl)-4-(4-methylphenyl)butan-1-one, hydrochloride (33e**)**



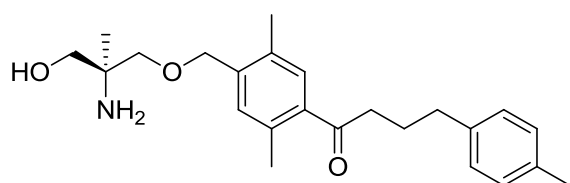
Methyl (2*R*,4*R*)-2-*tert*-butyl-4-[(2-chloro-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl]oxy)methyl]-4-methyl-1,3-oxazolidine-3-carboxylate **117e** (1.0 g, 5.4 mmol) の MeOH (10 ml) 溶液に *p*-TsOH monohydrate (0.76 g, 4.0 mmol) を加え、50°C で 2 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、粗生成物として methyl [(2*S*)-1-(2-chloro-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl)oxy]-3-hydroxy-2-methylpropan-2-yl]carbamate **118e** を黄色油状物質として得た。得られた **118e** を EtOH (20 ml) で希釈し、8 規定 KOH 水溶液 (2.5 ml, 20 mmol) を加え、加熱還流下、6 時間攪拌した。室温まで冷却後、減圧下溶媒を留去し、水を加え、CH₂Cl₂ (30 ml x 2) で抽出した。有機層を水 (40 ml) および飽和食塩水 (40 ml) で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去して、化合物 **33e** のフリー体を黄色油状物質として得た。得られたフリー体を EtOH (15 ml) で希釈し、4 規定 HCl/dioxane (1.0 ml) を加え、室温で 1 時間攪拌した。減圧下溶媒を留去して、生成した固体を Et₂O でろ取り、標記化合物 **33e** (0.58 g, 90%) を無色固体物質として得た。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.20 (s, 3H), 1.91-1.84 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.04 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.62-3.45 (m, 4H), 4.68 (s, 2H), 5.47 (t, 1H, *J* = 5.4 Hz), 7.09 (s, 4H), 7.78 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.91 (d, 1H, *J* = 8.3 Hz), 7.94 (brs, 1H), 8.00 (brs, 3H); IR (KBr) 3384, 3018, 2935, 1692, 1198, 1129, 1044, 808 cm⁻¹; MS(FAB) *m/z*: 390 (M+H)⁺; *Anal.* Calcd for C₂₂H₂₈ClNO₃·HCl: C, 59.46; H, 7.03; N, 3.15; Cl, 15.96. Found: C, 59.59; H, 6.72; N, 3.20; Cl, 16.81.

1-(4-[(2*S*)-2-Amino-3-hydroxy-2-methylpropoxy]methyl)-3-ethylphenyl)-4-(4-methylphenyl)butan-1-one, 0.5 oxalic acid (33f)



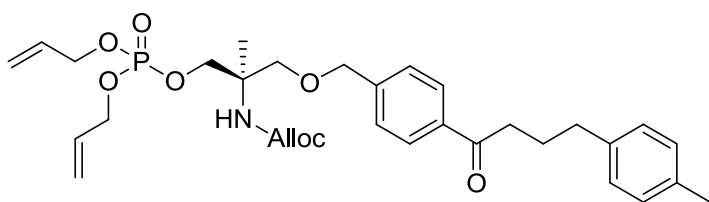
標記化合物 **33f** は化合物 **26** を出発原料とし、化合物 **33e** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。なお、化合物 **33f** は 0.5 シュウ酸塩として、全 4 工程、18% で得られた。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.04 (s, 3H), 1.18 (t, 3H, *J* = 7.6 Hz), 1.91-1.85 (m, 2H), 2.26 (s, 3H), 2.59 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 2.67 (q, 2H, *J* = 7.6 Hz), 3.01 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz), 3.39-3.29 (m, 4H), 4.60 (s, 2H), 7.09 (s, 4H), 7.51 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz), 7.74 (s, 1H), 7.75 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz); IR (KBr) 3288, 2967, 2949, 2592, 1688, 1626, 1565, 1293, 1112, 1052, 796 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₂₄H₃₄NO₃ [M+H]⁺: 384.2539, found 384.2539.

1-(4-[(2*S*)-2-Amino-3-hydroxy-2-methylpropoxy]methyl)-2,5-dimethylphenyl)-4-(4-methylphenyl)butan-1-one, 0.5 oxalic acid (33h)



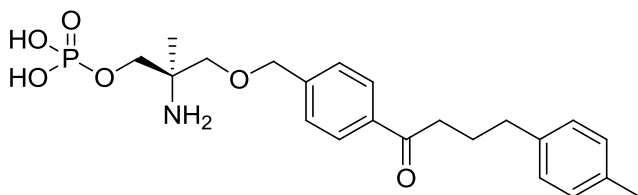
標記化合物 **33h** は化合物 **26** を出発原料とし、化合物 **33e** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。なお、化合物 **33h** は 0.5 シュウ酸塩として、全 4 工程、21% で得られた。¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.04 (s, 3H), 1.88-1.82 (m, 2H), 2.26 (s, 6H), 2.35 (s, 3H), 2.57 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 2.90 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.36-3.29 (m, 4H), 4.49 (s, 2H), 7.08 (s, 4H), 7.25 (s, 1H), 7.49 (s, 1H); IR (KBr) 2953, 2596, 1680, 1620, 1572, 1454, 1296, 1098, 1052, 797, 764 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₂₄H₃₄NO₃ [M+H]⁺: 384.2539, found 384.2542.

Allyl *N*-{(1*R*)-1-(diallyloxyphosphoryloxymethyl)-1-methyl-2-[[4-[4-(*p*-tolyl)-butanoyl]phenyl]methoxy]ethyl}carbamate (120a)



1-[4-[[[(2S)-2-Amino-3-hydroxy-2-methyl-propoxy]methyl]-phenyl]-4-(*p*-tolyl)butan-1-one hydrochloride **33a** (0.15 g, 0.40 mmol)を AcOEt (4.0 ml)と水 (4.0 ml)の混合溶媒に加え、さらに、 KHCO_3 (88 mg, 0.90 mmol)と allyl chloroformate (0.050 ml, 0.46 mmol)を加え、室温で2時間攪拌した。反応液を AcOEt (200 ml x 2)で抽出し、有機層を飽和重曹水 (50 ml)および飽和食塩水 (50 ml)で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、粗生成物の allyl *N*-[(1*S*)-1-(hydroxymethyl)-1-methyl-2-[[4-[4-(*p*-tolyl)butanoyl]phenyl]methoxy]ethyl]carbamate を黄色油状物質として得た。得られた化合物の CH_2Cl_2 (3.0 ml)溶液を 0°C に冷却し、1*H*-tetrazole (0.18 g, 2.5 mmol)と diallyl diisopropylphosphoramidite ((AllylO) $_2$ PN*i*-Pr $_2$) (0.20 ml, 0.75 mmol)を加えた後、室温まで昇温し、12時間攪拌した。反応液を再度 0°C に冷却し、3-chloroperoxybenzoic acid (0.20 g, 0.80 mmol)を加えた後、室温まで昇温し、1時間攪拌した。反応液に 10% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液 (10 ml)を加え、 CH_2Cl_2 (30 ml x 2)で抽出した。有機層を飽和 NaHCO_3 水溶液 (30 ml)および飽和食塩水 (50 ml)で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過後、減圧下溶媒を留去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (hexane:AcOEt = 5:1 to 0:1)により精製して、標記化合物 **120a** (0.23 g, 99%)を淡黄色油状物質として得た。 ^1H NMR (400MHz, CD_3Cl) δ 1.37 (s, 3H), 2.03-2.00 (m, 3H), 2.28 (s, 3H), 2.64 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 2.91 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.48 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 3.61 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 4.17-4.11 (m, 2H), 4.57-4.45 (m, 6H), 5.31-5.19 (m, 6H), 5.93-5.83 (m, 3H), 7.04 (s, 4H), 7.32 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz), 7.84 (d, 2H, $J = 8.2$ Hz); IR (KBr) 2925, 2854, 1724, 1684, 1463, 1262, 1028 cm^{-1} ; MS(FAB) m/z : 600 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

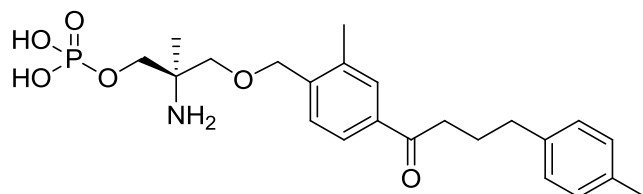
(2R)-2-Amino-2-methyl-3-({4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl}oxy)propyl-dihydrogen phosphate (33a-P)



Allyl *N*-[(1*R*)-1-(diallyloxyphosphoryloxymethyl)-1-methyl-2-[[4-[4-(*p*-tolyl)-butanoyl]phenyl]methoxy]ethyl]carbamate **120a** (0.23 g, 0.40 mmol)の acetonitrile (5.0

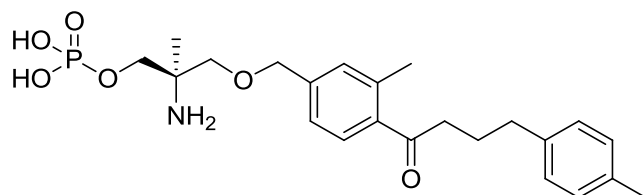
ml)溶液に、tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (24 mg, 20 μmol)、triphenylphosphine (22 mg, 80 μmol)、pyrrolidine (0.22 ml, 2.6 mmol)を加え、窒素雰囲気下、室温で24時間攪拌した。減圧下溶媒を留去し、得られた残渣を20% EtOH水溶液 (6.0 ml)に溶解し、その溶液に charcoalを加えた。室温で5分間攪拌した後、charcoalをセライトろ過した。ろ液に TFA (10 μl)を加え、析出した固体をろ過し、EtOH (4.0 ml)洗浄を行い、粗生成物の標記化合物 **33a-P**を淡黄色固体として得た。得られた粗生成物は pyrrolidine (4.0 ml)と EtOH (4.0 ml)の混合溶媒に加え、不溶物をろ過した後、ろ液に TFA (80 μl)を加えることで再度結晶を析出させた。析出した結晶をろ過し、EtOH (4 ml)洗浄を行うことで、高純度の標記化合物 **33a-P** (74 mg, 46%)を淡黄色固体として得た。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}$) δ 1.48 (s, 3H), 1.98-2.07 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.65 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 3.02 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz), 3.73 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 3.79 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 4.22-4.34 (m, 2H), 4.69 (s, 2H), 7.08 (s, 4H), 7.49 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz), 7.95 (d, 2H, $J = 8.0$ Hz); IR (KBr) 3192, 2955, 2594, 1681, 1609, 1517, 1282, 1105, 1033, 796 cm^{-1} ; HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_6\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 436.1889, found 436.1891.

(2R)-2-Amino-2-methyl-3-({2-methyl-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl}oxy)propyl dihydrogen phosphate (33b-P)



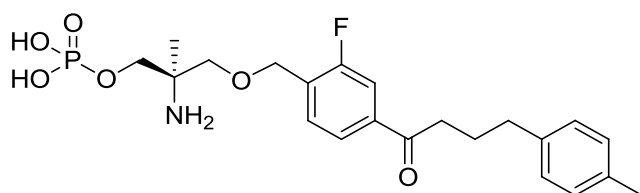
標記化合物 **33b-P**は化合物 **33b**を出発原料とし、化合物 **33a-P**と同様の合成方法により無色固体物質として得た。化合物 **33b-P**は全2工程、25%で得られた。 $^1\text{H NMR}$ (400MHz, $\text{CD}_3\text{CO}_2\text{D}$) δ 1.47 (s, 3H), 1.98-2.01 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.32 (s, 3H), 2.62 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 2.97 (t, 2H, $J = 7.4$ Hz), 3.37 (brs, 2H), 4.20-4.36 (m, 4H), 4.60 (s, 2H), 7.03 (brs, 4H), 7.47 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.69 (s, 1H), 7.70 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz); IR (KBr) 2953, 2602, 1686, 1549, 1210, 1183, 1037, 939, 797 cm^{-1} ; HRMS (ESI): calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{NO}_6\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 450.2045, found 450.2045.

(2R)-2-Amino-2-methyl-3-({3-methyl-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl}oxy)propyl dihydrogen phosphate (33c-P)



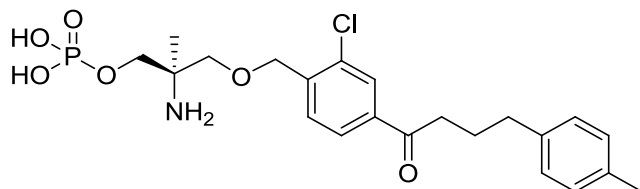
標記化合物 **33c-P** は化合物 **33c** を出発原料とし、化合物 **33a-P** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。化合物 **33c-P** は全 2 工程、30% で得られた。¹H NMR (400MHz, CD₃CO₂D) δ 1.43 (s, 3H), 1.84-2.05 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.47 (s, 3H), 2.64 (brs, 2H), 2.93 (brs, 2H), 3.61 (d, 1H, *J* = 10.3 Hz), 3.76 (d, 1H, *J* = 10.3 Hz), 4.08-4.22 (m, 2H), 4.58 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz), 4.64 (d, 1H, *J* = 12.2 Hz), 7.07 (brs, 4H), 7.27 (brs, 2H), 7.64 (brs, 1H); IR (KBr) 2924, 2608, 1685, 1611, 1549, 1448, 1179, 1065, 942, 808, 505 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₂₃H₃₃NO₆P [M+H]⁺: 450.2045, found 450.2043.

(2R)-2-Amino-3-({2-fluoro-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl}oxy)-2-methylpropyl dihydrogen phosphate (33d-P)



標記化合物 **33d-P** は化合物 **33d** を出発原料とし、化合物 **33a-P** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。化合物 **33d-P** は全 2 工程、31% で得られた。¹H NMR (400MHz, CD₃CO₂D) δ 1.50 (s, 3H), 1.98-2.06 (m, 2H), 2.27 (s, 3H), 2.66 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 3.00 (t, 2H, *J* = 7.6 Hz), 3.82 (d, 2H, *J* = 6.6 Hz), 4.25-4.30 (m, 1H), 4.34-4.38 (m, 1H), 4.75 (s, 2H), 7.08 (s, 4H), 7.62-7.69 (m, 2H), 7.77-7.79 (m, 1H); IR (KBr) 2945, 2611, 1687, 1577, 1418, 1183, 1039, 945, 810, 513 cm⁻¹; MS (FAB) *m/z*: 452 (M-H)⁻; Anal. Calcd for C₂₂H₂₉FNO₆P: C, 58.27; H, 6.45; N, 3.09; F, 4.19; P, 6.83. Found: C, 57.59; H, 5.68; N, 3.11; F, 4.29; P, 6.78.

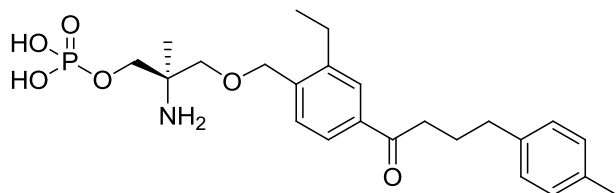
(2R)-2-Amino-3-({2-chloro-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl}oxy)-2-methylpropyl dihydrogen phosphate (33e-P)



標記化合物 **33e-P** は化合物 **33e** を出発原料とし、化合物 **33a-P** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。化合物 **33e-P** は全 2 工程、31% で得られた。¹H NMR (400MHz, CD₃CO₂D) δ 1.42 (s, 3H), 1.88-1.95 (m, 2H), 2.17 (s, 3H), 2.55 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 2.90 (t, 2H, *J* = 7.1 Hz), 3.73 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 3.87 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 4.16-4.20 (m, 1H), 4.25-4.28 (m, 1H), 4.56 (s, 2H), 6.97 (brs, 4H), 7.63 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.78 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.82 (s, 1H); IR (KBr) 2923, 2612, 1686, 1560, 1182, 1039, 943, 811

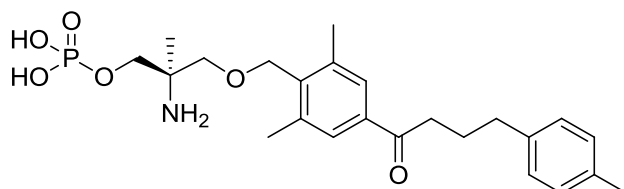
cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₂₂H₃₀NO₆PCl [M+H]⁺: 470.1499, found 470.1499.

(2R)-2-Amino-3-({2-ethyl-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl}oxy)-2-methylpropyl dihydrogen phosphate (33f-P)



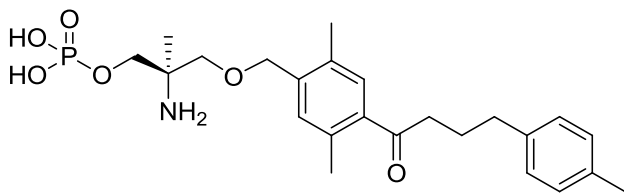
標記化合物 **33f-P** は化合物 **33f** を出発原料とし、化合物 **33a-P** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。化合物 **33f-P** は全 2 工程、20%で得られた。¹H NMR (400MHz, CD₃CO₂D) δ 1.20 (t, 3H, *J* = 7.4 Hz), 1.39 (s, 3H), 1.95-2.06 (m, 2H), 2.24 (s, 3H), 2.60-2.69 (m, 4H), 2.97 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz), 3.60 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz), 3.76 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz), 4.10 (d, 2H, *J* = 10.6 Hz), 4.65 (d, 2H, *J* = 19.0 Hz), 7.02 (brs, 4H), 7.48 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.73 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 7.74 (s, 1H); IR (KBr) 2958, 2609, 1689, 1455, 1205, 1104, 1065, 944, 838, 520 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₂₄H₃₅NO₆P [M+H]⁺: 464.2202, found 464.2204.

(2R)-2-Amino-3-({2,6-dimethyl-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl}oxy)-2-methylpropyl dihydrogen phosphate (33g-P)



標記化合物 **33g-P** は化合物 **33g** を出発原料とし、化合物 **33a-P** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。化合物 **33g-P** は全 2 工程、16%で得られた。¹H NMR (400MHz, CD₃CO₂D) δ 1.38 (s, 3H), 1.95-2.06 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.44 (s, 6H), 2.65 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.98 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.33-3.36 (m, 4H), 3.60 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz), 3.79 (d, 1H, *J* = 9.5 Hz), 4.10 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz), 4.70 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz), 7.08 (s, 4H), 7.60 (s, 2H); IR (KBr) 2950, 2468, 2229, 1683, 1578, 1458, 1285, 1121, 1066, 1037, 969, 767 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₂₄H₃₄NO₆P [M-H]⁻: 462.2045, found 462.2037.

(2R)-2-Amino-3-({2,5-dimethyl-4-[4-(4-methylphenyl)butanoyl]benzyl}oxy)-2-methylpropyl dihydrogen phosphate (33h-P)



標記化合物 **33h-P** は化合物 **33h** を出発原料とし、化合物 **33a-P** と同様の合成方法により無色固体物質として得た。化合物 **33h-P** は全 2 工程、20% で得られた。¹H NMR (400MHz, CD₃CO₂D) δ 1.42 (s, 3H), 1.92-2.06 (m, 2H), 2.28 (s, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.64 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 2.91 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz), 3.35 (brs, 2H), 3.61 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz), 3.77 (d, 1H, *J* = 9.8 Hz), 4.09-4.19 (m, 2H), 4.59 (q, 2H, *J* = 12.2 Hz), 7.07 (s, 4H), 7.25 (s, 1H), 7.40 (s, 1H); IR (KBr) 2923, 2595, 1681, 1558, 1457, 1192, 1135, 1092, 1052, 971, 804 cm⁻¹; HRMS (ESI): calcd for C₂₄H₃₄NO₆P [M-H]⁻: 462.2045, found 462.2043.

Biology

In vitro [³⁵S] GTPγ-S binding assay

用いる GTPγ-S binding assay の基本的な操作手順は、文献^{20b)}に記載されており、文献記載の手順に準じて実施した。まず、58 μl の assay buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 0.10 M NaCl, 5.0 mM MgCl₂, 0.050 mg/ml Saponin) と 10 μl の 50 μM GDP solution (50 μM GDP, 54 μM DTT, 50 mM HEPES, pH 7.5, 0.10 M NaCl, 5.0 mM MgCl₂, 0.050 mg/ml Saponin) を 96-well プレート (Sumitomo Bakelite Co., Ltd. SUMILON Proteosave 96 U plate) の各 well に加えた。そこに、各濃度に調製した被験化合物 (**33-P**、**6-P**、**8**) を 2.0 μl ずつ加えた。対照群としては、2.0 μl の 20 mM Pyrrolidine または MeOH を加えた。その後、3.5 nM [³⁵S] GTPγ-S 溶液 (10 μl) と assay buffer で希釈した 0.50 mg/ml 各 EDG 受容体発現 CHO 細胞 (20 μl) を加え、反応を開始させた。室温で 1 時間インキュベーションした後、UniFilter-96, GF/C (PerkinElmer life sciences) に移し、洗浄用 buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 0.10 M NaCl, 5.0 mM MgCl₂) (0.20 ml x5) で洗浄した。最終的に同 buffer が各 well に 15 μl ずつ残る状態にした後、MICROSCINT 20 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) (50 μl) を加えた。その後、細胞内 Ca²⁺濃度の変化をモニターした。アゴニスト活性はシグナルの面積で評価し、**6-P** 10 μM の面積を 100% として、50% の面積を与える濃度を EC₅₀ 値として求めた。

Lymphocyte counts following oral administration in rats.

試験に使用する動物は、LEW ラット (雄、5 週齢、日本チャールス・リバー株式会社) を使用し、1 群 5 匹のマウスを用いた。被験化合物は 1.0% トラガント液 (溶媒) に懸濁させ、被験化合物懸濁液を、マウスの体重 1.0 kg 当たり 5.0 ml の割合で強制経口投与した。なお、正常群には検体の代わりに 1.0% トラガント液を投与した。

溶媒あるいは被験化合物懸濁液投与 3 時間後に、エーテル麻酔下、下大静脈より採血を行い、EDTA 入りチューブに移した。その後、血液学検査装置 (Technicon) でリンパ球の絶対数を測定した。正常群のリンパ球数を 100 % とした時の被験化合物によるリンパ球数減少作用を相対値 (%) で算出した。

Inhibitory activities against Host versus Graft Reaction in rats (HvGR)

第 2 章実験の部に記載した方法に準じて実施した。

Heart rate decrease following oral administration in rats.

試験には、ラット (Iar:Wistar-Imamichi rat) を用いた。1 群 3 匹のラットを使用した。各被験化合物を 1.0% MC 溶液に懸濁させ、ラットに経口投与した。なお、正常群には検体の代わりに 1.0%MC 液を投与した。化合物投与後、0.5 時間、1 時間、1.5 時間、2 時間、2.5 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間、24 時間と 48 時間の時点で心拍数 (bpm) を測定した。48 時間の計測値のうち、各個体の心拍数の最大値 (もしくは最小値) を対照群に対する変化量 = “Heart rate decrease (%)” として評価した。

Evaluation of phosphorylation rate in *in vitro*.

試験には、ラット (Iar:Wistar-Imamichi rat) を用いた。まず、以下に示す方法に従い、ラット未洗浄赤血球画分の調製を行った。抗凝固剤として 3.2 %クエン酸水溶液を用い、ラットより採血を行った。血液を、900 rpm、4.0°C、15 分間遠心後、上清を捨て、残りを未洗浄赤血球画分として、以下用いた。ラット未洗浄赤血球画分 0.50 ml に、被験化合物 (0.10 g/ml in DMSO) を 0.50 μ l 加え、37°C、3 時間インキュベートした。反応終了後、1.0 ml の MeOH を反応液に加え、激しく攪拌後、15,000 rpm、4°C、5 分間遠心分離し、上清をもう一度、15,000 rpm、4°C、10 分間遠心分離した。上清の一部を用いて、リン酸化効率を測定し、残りの上清は、HPLC での分取用に約 1/10 程度まで濃縮した。濃縮後は、-20°C で保存した。濃縮したサンプルに、HPLC の移動層を 0.30 ml 加え、攪拌後、沈殿物を遠心で除去し、上清 0.20 ml を HPLC で分取を行った。HPLC の条件は、以下の通りである。カラム: YMC-pack ODS A-312、acetonitrile/water(0.1%TFA) = 30:70 (0 min) to 90:10 (30 min)、流速: 1.0 ml/min、温度: 40°C、検出波長: 220、230、254、296 nm。

親化合物 **33** とそのリン酸エステル体 **33-P** では、UV 吸収に関与する部分は変化がなく、両化合物のモル吸光係数は同じとして、概算した。リン酸化効率は以下に示す式で計算した。(式 3)

リン酸化効率 (%) = (リン酸化化合物のクロマトグラム上の面積) / (リン酸化化合物の

クロマトグラム上の面積+親化合物のクロマトグラム上の面積) x 100 (式 3)

Molecular Modeling

Induced fit docking in S1P₁.

33f-P のコンフォメーションは Ligprep⁸⁸⁾プログラムを使用し、S1P₁ の結晶構造 (Protein Data Bank entry 3V2Y)⁸⁶⁾を用いた SCHRÖDINGER 社 induced fit docking protocol⁸⁸⁾により算出した。

Homology modeling of S1P₃.

S1P₃ のホモロジーモデルは SCHRÖDINGER 社 induced fit docking protocol⁸⁸⁾により算出した induced fit docking モデルにより算出した S1P₁ と **33f-P** の構造に基づき、Prime プログラム⁸⁸⁾を使用して作成した。

参考文献

1. 矢野 明彦、豊島 聰、吉田 正、田坂 捷雄「医学・薬学のための免疫学」東京化学同人 2008 年.
2. Barrat F. J.; Meeker, T.; Gregorio, J.; Chan, J. H.; Uematsu, S.; Akira, S.; Chang, B.; Duramad, O.; Coffman, R. L. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 1131-1139.
3. 厚生労働省健康局疾病対策課 リウマチ・アレルギー対策委員会報告書 2011 年.
4. Genestier, L.; Paillot, R.; Quemeneur, L.; Izeradjene, K.; Revillard, J. P. *Immunopharmacology* **2000**, *47*, 247-257.
5. (a) Laupacis, A.; Keown, P. A.; Ulan, R. A.; McKenzie, N.; Stiller, C. R. *Can. Med. Assoc. J.* **1982**, *126*, 1041-1046. (b) Matsuda, S.; Koyasu, S. *Immunopharmacology* **2000**, *47*, 119-125. (c) Forsythe, P.; Paterson, S. *Veterinary Record* **2014**, *174*, 13-21.
6. (a) Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1249-1256. (b) Kino, T.; Hatanaka, H.; Miyata, S.; Inamura, N.; Nishiyama, M.; Yajima, T.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Ochiai, T. *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1256-1265.
7. (a) Liu, J.; Farmer, J. D.; Lane, W. S.; Friedman, J.; Weissman, I.; Schreiber, S. L. *Cell* **1991**, *66*, 807-815. (b) Schreiber, S. L.; Crabtree, G. R. *Immunol. Today* **1992**, *13*, 136-142.
8. (a) 福島 雅典：監修 「メルクマニュアル第 18 版 日本語版」 2006 年 (b) Hedayat, S.; Kershner, R. P.; Su, G. *J. Biopharm Stat.* **1996**, *6*, 411-424.
9. 竹内 勤「リウマチ 生物学的製剤編」メディカルレビュー社 2010 年.
10. Fujita, T.; Inoue, K.; Yamamoto, S.; Ikumoto, T.; Sasaki, S.; Toyama, R.; Chiba, K.; Hoshino, Y.; Okumoto, T. *J. Antibiot.* **1994**, *47*, 208-215.
11. Miyake, Y.; Kozutsumi, Y.; Nakamura, S.; Fujita, T.; Kawasaki, T. *Biochem. And Biophysic. Res. Commun.* **1995**, *211*, 396-403.
12. (a) Yoshikawa, M.; Yokokawa, Y.; Okuno, Y.; Yagi, N.; Murakami, N. *Chem. Pharm. Bull.* **1995**, *43*, 1647-1653. (b) Fujita, T.; Yoneta, M.; Hirose, R.; Sasaki, S.; Inoue, K.; Kiuchi, M.; Hirase, S.; Adachi, K.; Arita, M.; Chiba, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 847-852. (c) Fujita, T.; Hirose, R.; Hamamichi, N.; Kitao, Y.; Sasaki, S.; Yoneta, M.; Chiba, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 1857-1860.
13. Adachi, K.; Kohara, T.; Nakao, N.; Arita, M.; Chiba, K.; Mishina, T.; Sasaki, S.; Fujita, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 853-856.
14. (a) Chiba, K.; Hoshino, Y.; Suzuki, C. *Transplant. Proc.* **1996**, *28*, 1056-1059. (b) Chiba, K.; Yanagawa, Y.; Masubuchi, Y. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 5037-5044. (c)

- Yanagawa, Y.; Sugahara, K.; Kataoka, H. *J. Immunol.* **1998**, *160*, 5493-5499. (d) Brinkmann, V.; Pinschewer, D. D.; Chiba, K. *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, *21*, 49-52.
15. (a) 蛋白質 酵素 核酸 43 卷 16 号 1998 年. (b) 蛋白質 酵素 核酸 47 卷 4 号 2002 年. (c) 五十嵐 靖之、平林 義雄、小堤 保則、鈴木 明身：編集「マイクロドメイン形成と細胞のシグナリング」共立出版 2003 年. (d) Hakomori, S. *Annual Review of Biochemistry*, **1981**, *50*, 733-764. (e) Hakomori, S. In *Sphingolipid Biochemistry*; Kanfer, J. N., Hakomori, S., Eds.; Plenum: New York, **1983**, 1-164. (f) Stults, C. L. M.; Sweely, C. C.; Machner, B. A. *Methods Enzymol.* **1989**, *50*, 167-214. (g) Schmidt, R. R. *Pure Appl. Chem.* **1989**, *61*, 1257-1270. (h) Merrill, Jr., A. H.; Sweely, C. C. *Sphingolipids: metabolism and cell signaling*; Elsevier Science: Amsterdam, **2002**.
16. 五十嵐 靖之 *生化学*, **1997**, *69*, 1166-1185.
17. Lee, M.-J.; Van Brocklyn, J. R.; Thangada, S.; Liu, C. H.; Hand, A. R.; Menzeleev, R.; Spiegel, S.; Hla, T. *Science*, **1998**, *279*, 1552-1555.
18. (a) Kon, J.; Sato, K.; Watanabe, T.; Tomura, H.; Kuwabara, A.; Kimura, T.; Tamama, K.; Ishizuka, T.; Murata, N.; Kanda, T.; Kobayashi, I.; Ohta, H.; Ui, M.; Okajima, F. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 23940-23947. (b) Van Brocklyn, J. R.; Tu, Z.; Edsall, L. C.; Schmidt, R. R.; Spiegel, S. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 4626-4632. (c) Yamazaki, Y.; Kon, J.; Sato, K.; Tomura, H.; Sato, M.; Yoneya, T.; Okazaki, H.; Okajima, F.; Ohta, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *268*, 583-589. (d) Im, D. S.; Heise, C. E.; Ancellin, N.; O'Dowd, B. F.; Shei, G. J.; Heavens, R. P.; Rigby, M. R.; Hla, T.; Mandala, S.; McAllister, G.; George, S. R.; Lynch, K. R. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 14281-14286.
19. Lee, M.-J.; Thangada, S.; Claffey, K. P.; Ancellin, N.; Liu, C. H.; Kluk, M.; Volpi, M.; Shaafi, R. I.; Hla, T. *Cell*, **1999**, *99*, 301-312.
20. (a) Mandala, S.; Hajdu, R.; Bergstrom, J.; Quackenbush, E.; Xie, J.; Milligan, J.; Thornton, R.; Shei, G.; Card, D.; Keohane, C.; Rosenbach, M.; Hale, J.; Lynch, C. L.; Rupperecht, K.; Parsons, W.; Rosen, H. *Science* **2002**, *296*, 346-349. (b) Brinkmann, V.; Davis, M. D.; Heise, C. E.; Albert, R.; Cottens, S.; Hof, R.; Bruns, C.; Prieschl, E.; Baumruker, T.; Hiestand, P.; Foster, C. A.; Zollinger, M.; Lynch, K. R. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21453-21457.
21. Pham, T. H.; Okada, T.; Matloubian, M.; Lo, C.G.; Cyster, J. G. *Immunity* **2008**, *28*, 122-133.
22. Sanna, M. G.; Liao, J.; Jo, E.; Alfonso, C.; Ahn, M.-Y.; Peterson, M. S.; Webb, B.; Lefebvre, S.; Chun, J.; Gray, N.; Rosen, H. *J. Biol. Chem.* **2004**, *14*, 13839-13848.

23. Song, J.; Matsuda, C.; Kai, Y.; Nishida, T.; Nakajima, K.; Mizushima, T.; Kinoshita, M.; Yasue, T.; Sawa, Y.; Ito, T. *J. Pharmacol Exp Ther.* **2008**, *324*, 276-283, and references cited therein.
24. (a) Nishi, T.; Takemoto, T.; Shimozato, T.; Nara, F. US Patent-6723745, **2004**. (b) Nishi, T.; Takemoto, T.; Miyazaki, S.; Shimozato, T.; Nara, F.; Izumi, T. EP1733724 A1, **2006**. (c) Nishi, T.; Miyazaki, S.; Takemoto, T.; Suzuki, K.; Iio, Y.; Nakajima, K.; Ohnuki, T.; Kawase, Y.; Nara, F.; Inaba, S.; Izumi, T.; Yuita, H.; Ohshima, K.; Doi, H.; Inoue, R.; Tomisato, W.; Kagari, T.; Shimozato, T. *ACS Med. Chem. Lett.* **2011**, *2*, 368-372.
25. (a) Bolli, M.; Scherz, M.; Mathys, B.; Binkert, C.; Mueller, C. WO2005/54215 A1, **2005**. (b) Bolli, M. H.; Abele, S.; Binkert, C.; Bravo, R.; Buchmann, S.; Bur, D.; Gatfield, J.; Hess, P.; Kohl, C.; Mangold, C.; Mathys, B.; Menyhart, K.; Mueller, C.; Nayler, O.; Scherz, M.; Schmidt, G.; Sippel, V.; Steiner, B.; Strasser, D.; Treiber, A.; Weller, T. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4198-4211. (c) Herse, C. WO2014/27330 A1, **2014**.
26. (a) Ciszewski, L.; De La Cruz, M.; Karpinski, P. H.; Mutz, M.; Riegert, C.; Vogel, C.; Schneeberger, R. WO2010/80409 A1, **2010**. (b) Gallou, F.; Sedelmeier, J. M.; Vogel, C. WO2013/113915 A1, **2013**. (c) Shifeng, P.; Nathanael, S. G.; Wenqi, G.; Yuan, M.; Yi, F.; Xing, W.; Tove, T.; Jianwei, C.; Sophie, L.; Yu, C.; Alan, C.; Klaus, H.; Anne, G.; Peter, E.; Peter, H.; Christian B.; Nigel G. C.; Barbara, N-H. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 333-337.
27. Tsuji, T.; Iio, Y.; Takemoto, T.; Nishi, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2005**, *16*, 3139-3142.
28. Tsuji, T.; Nakamura, T.; Suzuki, K.; Nishi, T. *Tetrahedron* **2014**, *70*, 5234-5241.
29. Ohnuki, T.; Tsuji, T.; Miyazaki, S.; Moriguchi, T.; Nishi, T. *Synlett* **2009**, *6*, 910-912.
30. Tsuji, T.; Suzuki, K.; Nakamura, T.; Goto, T.; Sekiguchi, Y.; Ikeda, T.; Fukuda, T.; Takemoto, T.; Mizuno, Y.; Kimura, T.; Kawase, Y.; Nara, F.; Kagari, T.; Shimozato, T.; Yahara, C.; Inaba, S.; Honda, T.; Izumi, T.; Tamura M.; Nishi, T. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5246-5256.
31. (a) Billich, A.; Bornancin, F.; Devay, P.; Mechtcheriakova, D.; Urtz, N.; Baumruker, Th. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 47408-47415. (b) Allende, M. L.; Sasaki, T.; Kawai, H.; Olivera, A.; Mi, Y.; Van Echeten-Deckert, G.; Hajdu, R.; Rosenbach, M.; Keohane, C. A.; Mandala, S.; Spiegel, S.; Proia, R. L. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 52487-52492.
32. (a) Albert, R.; Hinterding, K.; Brinkmann, V.; Guerini, D.; Muller-Hartweg, C.; Knecht, H.; Simeon, C.; Streiff, M.; Wagner, T.; Welzenbach, K.; Zecri, F.; Zollinger,

- M.; Cooke, N.; Francotte, E. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 5373-5377. (b) Kiuchi, M.; Adachi, K.; Tomatsu, A.; Chino, M.; Takeda, S.; Tanaka, Y.; Maeda, Y.; Sato, N.; Mitsutomi, N.; Sugahara, K.; Chiba, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 425-432.
33. Kiuchi, M.; Adachi, K.; Kohara, T.; Teshima, K.; Masubuchi, Y.; Mishina, T.; Fujita, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, *8*, 101-106.
34. Noyori, R.; Okhuma, T.; Kitamura, M.; Takaya, H.; Sayo, N.; Kumobayashi, H.; Akuragawa, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 5856-5858.
35. Katsuki, T.; Sharpless, K. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5974-5976.
36. Caprio, V.; Williams, J. *Catalysis in Asymmetric Synthesis (Postgraduate Chemistry Series)*, Wiley-Blackwell.
37. Garcia-Urdiales, E.; Alfonso, I.; Gotor, V. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 313-354.
38. (a) 清水 昌、大竹 久夫、藤尾 達郎、穴澤 秀治：編集「微生物機能を応用した革新的生産技術の最前線」シーエムシー出版 2007年. (b) Polaina, J.; MacCabe, A. P. *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications*, Springer.
39. (a) Hinterding, K.; Albert, R.; Cottens, S. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8095-8097; (b) Hinterding, K.; Cottens, S.; Albert, R.; Zecri, F.; Buehlmayer, P.; Spanka, C.; Brinkmann, V.; Nussbaumer, P.; Etmayer, P.; Hoegenauer, K.; Gray, N.; Pan, S. *Synthesis* **2003**, 1667-1670.
40. (a) Faber, K.; Riva, S. *Synthesis* **1992**, 895-910. (b) Santaniello, E.; Ferraboschi, P.; Grisenti, P.; Manzocchi, A. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1071-1140. (c) Theil, F. *Chem. Rev.* **1995**, *95*, 2203-2227. (d) Nakamura, K.; Hirose, Y. *J. Synth. Org. Chem., Jpn.* **1995**, *53*, 668-677. (e) Schoffers, E.; Golebiowski, A.; Johnson, C. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 3769-3826. (f) Yokomatsu, T.; Minowa, T.; Murano, T.; Shibuya, S. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 9341-9356. (g) Alexandre, F. R.; Huet, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 2301-2310. (h) Ogasawara, K. *J. Syn. Org. Chem. Jpn.* **1999**, *57*, 957-968. (i) Neri, C.; Willims, J. M. J. *Tetrahedron: Asymmetry* **2002**, *13*, 2197-2199. (j) Neri, C.; Willims, J. M. J. *Adv. Synth. Catal.* **2003**, *345*, 835-848. (k) Batovska, D. I.; Tsubota, S.; Kato, Y.; Asano, Y.; Ubukata, M. *Tetrahedron: Asymmetry* **2004**, *15*, 3551-3559. (l) Choi, J. Y.; Borch, R. F. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 215-218, and references cited therein.
41. (a) Fadel, A.; Arzel, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 283-291. (b) Akai, S.; Naka, T.; Takebe, Y.; Kita, Y. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 4243-4246. (c) Guanti, G.; Narisano, E.; Riva, R. *Tetrahedron: Asymmetry* **1998**, *9*, 1859-1862.
42. Avenoza, A.; Cativiela, C.; Peregrina, J. M.; Sucunza, D.; Zurbano, M. M. *Tetrahedron: Asymmetry* **1999**, *10*, 4653-4661.
43. (a) Nakamura, T.; Tsuji, T.; Iio, Y.; Miyazaki, S.; Takemoto, T.; Nishi, T.

- Tetrahedron: Asymmetry* **2006**, *17*, 2781-2792. (b) Nishi, T.; Nakamura, T.; Nakamura, Y. *J. Syn. Org. Chem. Jpn.* **2014**, *72*, 808-821.
44. For example: (a) Cativiela C.; Diaz-de-Villegas M. D. *Tetrahedron: asymmetry* **2007**, *18*, 569-623. (b) Cativiela, C.; Ordonez, M. *Tetrahedron: asymmetry*, **2009**, *20*, 1-63, and references cited therein.
45. (a) Seebach, D.; Sting, A. R.; Hoffmann, M. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2708-2748. (b) Mossel, E.; Formaggio, F.; Toniolo, C.; Crisma, M.; Boesten, W. H. J.; Broxterman, Q. B.; Kamphuis, J.; Quaedflieg, P. J.; Temussi, P. *Tetrahedron: Asymmetry* **1997**, *8*, 1305-1314, and references cited therein. (c) Bellier, B.; McCort-Tranchenpain, I.; Ducos, B.; Danascimento, S.; Meudal, H.; Noble, F.; Garbay, C.; Roques, B. P. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3947-3956. (d) Wirth, T. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 225-227. (e) Evans, M. C.; Pradhan, A.; Venkatraman, S.; Ojala, W. H.; Gleason, W. B.; Mishra, R. K.; Johnson, R. L. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 1441-1447. (f) Toniolo, C.; Crisma, M.; Formaggio, F.; Peggion, C. *Biopolymers* **2001**, *60*, 396-419. (g) Venkatraman, J.; Shankaramma, S. C.; Balaram, P. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 3131-3152. (h) Tanaka, M. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 349-358. (i) Maity, P.; Konig, B. *Biopolymers* **2008**, *90*, 8-27. (j) Righi, M.; Bartoccini, F.; Lucarini, S.; Piersanti, G. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7923-7928.
46. Ichikawa, Y.; Matsuda, Y.; Okumura, K.; Nakamura, M.; Masuda, T.; Kotsuki, H.; Nakano, K. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 2520-2523.
47. Shinada, T.; Oe, K.; Ohfune, Y.; *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3250-3253.
48. (a) Shinada, T.; Ikebe, E.; Oe, K.; Namba, K.; Kawasaki, M.; Ohfune, Y. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1765-1767. (b) Shinada, T.; Oe, K.; Ohfune, Y. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3250-3253..
49. (a) Galley, G.; Groebke, Z. K.; Norcross, R.; Stalder, H. WO 2008/098857 A1. (b) Sotnikova, D. T.; Caron G. M.; Gainetdinov, R.R. *Molecular pharmacology* **2009**, *76*, 229-235.
50. Iio, Y.; Yamaoka, M.; Jin, M.; Nakamura, Y.; Nishi, T. *Tetrahedron: Asymmetry* **2011**, *22*, 323-328.
51. Rawal, V. H.; Jones, R. J.; Cava, M. P. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 19-28.
52. (a) Itaya, T.; Shimomichi, M.; Ozawa, M. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 4129-4132. (b) Itaya, T.; Iida, T.; Shimizu, S.; Mizutani, A.; Morisue, M.; Sugimoto, Y.; Tachinaka, M. *Chem. Pharm. Bull. Jpn.* **1993**, *41*, 252-261. (c) Itaya, T.; Kanai, T.; Iida, T. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 1979-1982.
53. (a) Sibi, M. P.; Rutherford, D.; Renhowe, P. A.; Li, B. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*,

- 7509-7516. (b) Sibi, M. P.; Christensen, J. W. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 6434–6442.
54. (a) Bagli, J. F.; Kluepfel, D.; St.-Jacques, M. *J. Org. Chem.* **1973**, *38*, 1253-1260. (b) Miyake, Y.; Kozutsumi, Y.; Nakamura, S.; Fujita, T.; Kawasaki, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *211*, 396-403. (c) Chen, J. K.; Lane, W. S.; Schreiber, S. L. *Chem. Biol.* **1999**, *6*, 221-235.
55. (a) Horn, W. S.; Smith, J. L.; Bills, G. F.; Raghoobar, S. L.; Helmes, G. L.; Kurta, M. B.; Marrina, J. A.; Frommer, B. R.; Thornton, R. A.; Mandala, S. M. *J. Antibiot.* **1992**, *45*, 1692-1696. (b) Ikeuchi, K.; Hayashi, M.; Yamamoto, T.; Inai, M.; Asakawa, T.; Hamashima, Y.; Kan, T. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, *30*, 6789-6792.
56. (a) Adachi, K.; Kohara, T.; Nakao, N.; Arita, M.; Chiba, K.; Mishina, T.; Sasaki, S.; Fujita, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 853-856. (b) Forrest, M.; Sun, S. -Y.; Hajdu, R.; Bergstrom, J.; Card, D.; Doherty, G.; Hale, J.; Keohane, C.; Meyers, C.; Milligan, J.; Mills, S.; Nomura, N.; Rosen, H.; Rosenbach, M.; Shei, G. -J.; Singer, I. I.; Tian, M.; West, S.; White, V.; Xie, J.; Proia, R. L.; Mandala, S. J. *Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *309*, 758-768. (c) Sanna, M. G.; Liao, J.; Jo, E.; Alfonso, C.; Ahn, M. -Y.; Peterson, M. S.; Webb, B.; Lefebvre, S.; Chun, J.; Gray, N.; Rosen, H. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 13839-13848.
57. For compound **65**, see: Kiuchi, M.; Tashiro, K.; Hamada, M.; Sugahara, K. EP 2168944, **2010**.
58. For compound **29**, see: Yamamuro, N.; Nakamaru, K.; Yasue, T. US324057, **2010**.
59. Seebach, D.; Stucky, G.; Renaud, P. *Chimia* **1988**, *42*, 176-178.
60. Yakura, T.; Yoshimoto, Y.; Ishida, C. *Chem. Pharm. Bull.* **2007**, *55*, 1385-1389.
61. The details are shown in our experimental section of compound **71**.
62. I tried to reuse **24-O** for the Wittig reaction by using the following procedure. To a solution of **24-O** (10 mg, 1 eq.) and LiBr (3 mg, 1 eq.) in THF (3 ml) was added *n*-butyllithium (1.9 M in hexane, 35 μ L, 2 eq.) at -30oC, and then the solution was stirred for 30 min. After cooling to -78oC, benzaldehyde **25a** (9 mg, 1 eq.) was added. The solution was gradually warmed to ambient temperature and stirred for 2 h. The reaction mixture was analyzed by LC-MS to detect no desired alkenes or coupling products but intact phosphine oxide **24-O**. For the reference, see; (a) Cavalla, D.;Cruse, W. B.; Warren, S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1987**, 1883. (b) Cavalla, D.; Warren, S. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 295-298.
63. Recent review for the mechanism of Wittig reaction, see: Byrne, P. A.; Gilheany, D. G. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6670-6696.
64. Aldehyde **25n** was synthesized from commercially available reagents by following a

procedure described in *reference 58*. The details are also shown in my experimental section.

65. Hale, J. J.; Yan, L.; Neway, W. E.; Hajdu, R.; Bergstrom, J. D.; Milligan, J. A.; Shei, G.-J.; Chrebet, G. L.; Thornton, R. A.; Card, D.; Rosenbach, M.; Rosen, H.; Mandala, S. *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 4803-4807.
66. Takeda, S.; Chino, M.; Kiuchi, M.; Adachi, K. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 5169-5172.
67. Kiuchi, M.; Adachi, K.; Tomatsu, A.; Chino, M.; Takeda, S.; Tanaka, Y.; Maeda, Y.; Sato, N.; Mitsutomi, N.; Sugahara, K.; Chiba, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 425-432.
68. (a) Schmuck, C.; Rupprecht, D. *Synthesis* **2007**, *20*, 3095-3110. (b) Taylor, J. E.; Jones, M. D.; Williams, J. M. J.; Bull, S. D. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5740-5743.
69. Yamaoka, M.; Nakamura, Y. EP2647635 A1, **2013**.
70. For example, see: (a) Akita, H. *Yakugaku Zasshi* **2011**, *131*, 269-284. (b) Rattanachuy P.; Kantachote D.; Tantirungkij, M.; Nitoda T.; Kanzaki H. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *27*, 869-880. (c) Arunrattiyakorn, P.; Suwannasai, N.; Aree, T.; Kanokmedhakul, S.; Ito, H.; Kanzaki, H. *J. Mol. Catal. B: Enz.* **2014**, *102*, 174-179.
71. (a) Endo, A. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 401-405. (b) Endo, A. *J. Lipid Res.* **1992**, *33*, 1569-1582. (c) Jonathan A. *Nature Reviews Drug Discovery* **2003**, *2*, 517-526.
72. (a) Katagiri, H.; Yamada, H.; Mitsugi, K.; Tsunoda, T. *Agric. Biol. Chem.* **1964**, *28*, 577-585. (b) Argoudelis, A. D.; Coats, J. H. *J. Antibiotics* **1969**, *7*, 341-343. (c) Rutkowski, M.; Korczak, E.; *Experientia* **1992**, *48*, 600-603. (d) Asano, Y.; Mihara, Y.; Yamada, H. *J. Mol. Catal. B* **1999**, *6*, 271-277. (e) Fang, K.; Schlingmann, G.; Enos, A.; Carter, G. T. *J. Antibiotics* **2001**, *54*, 805-809, and references cited therein.
73. BioCatalysis (ISIS/BASE).
74. Endo, A.; Yamashita, H.; Naoki, H.; Iwashita, T.; Mizukawa, Y. *J Antibiot.* **1985**, *38*, 328-332.
75. Agilent Technologies, *Application Note*, **1999**, 5968-6252E. The detail of system method is as follows. Column: Develosil ODS HG-5 (20φ x 150 mm), Mobile phase: 10 mM HCOONH₄ (pH 9.0)/ acetonitrile, Gradient: 10 ml/min, Split ratio: 4000/1, Make-up Flow: MeOH, 1.0 ml/min, ESI, neg, SIM, Operation software: Agilent Chemstation and CC-mode.
76. Matloubian, M.; Lo, C. G.; Cinamon, G.; Lesneski, M. J.; Xu, Y.; Brinkmann, V.; Allende, M. L.; Proia, R. L.; Cyster, J. G. *Nature* **2004**, *427*, 355-360.
77. (a) Kappos, L.; Antel, J.; Comi, G.; Montalban, X.; O'Conner, P.; Polman, C. H.; Haas,

- T.; Korn, A. A.; Karlsson, G.; Radue, E. W. *N. Engl. J. Med.* **2006**, *355*, 1124-1140.
- (b) Brinkmann, V. *Pharmacol. Ther.* **2007**, *115*, 84-105.
78. (a) Gergely, P.; Wallstrom, E.; Nuesslein-Hildesheim, B.; Bruns, C.; Zecri, F.; Cooke, N.; Traebert, M.; Tuntland, T.; Rosenberg, M.; Saltzman, M. *Mult. Scler.* **2009**, *15*, S125. (b) Hamada, M.; Nakamura, M.; Kiuchi, M.; Marukawa, K.; Tomatsu, A.; Shimano, K.; Sato, N.; Sugahara, K.; Asayama, M.; Takagi, K.; Adachi, K. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 3154-3168. (c) Legangneux, E.; Gardin, A.; Johns, D. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *75*, 831-841.
79. For recent studies regarding selective S1P₁ modulators, see: (a) Bolli, M. H.; Lescop, C.; Nayler, O. *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 726-757. (b) Asano, M.; Nakamura, T.; Sekiguchi, Y.; Mizuno, Y.; Yamaguchi, T.; Tamaki, K.; Shimozaoto, T.; Doi-Komuro, H.; Kagari, T.; Tomisato, W.; Inoue, R.; Yuita, H.; Oguchi-Oshima, K.; Kaneko, R.; Nara, F.; Kawase, Y.; Masubuchi, N.; Nakayama, S.; Koga, T.; Namba, E.; Nasu, H.; Nishi, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 3083-3088. (c) Reed, B. A.; Lanman, A. B.; Neira, S.; Harrington, E. P.; Sham, K. C. K.; Frohn, M.; Pickrell, J. A.; Tasker, S. A.; Gore, A.; Fiorino, M.; Itano, A.; McElvain, M.; Middleton, S.; Morrison, H.; Xu, H.; Xu, Y.; Wong, M.; Cee, J. V. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1779-1783. (d) Angst, D.; Janser, P.; Quancard, J.; Buehlmayer, P.; Berst, F.; Oberer, L.; Beerli, C.; Streiff, M.; Pally, C.; Hersperger, R.; Bruns, C.; Bassilana, F.; Bollbuck, B. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4286-4296. (e) Pan, S.; Gray, N. S.; Gao, W.; Mi, Y.; Fan, Y.; Wang, X.; Tuntland, T.; Che, J.; Lefebvre, S.; Chen, Y.; Chu, A.; Hinterding, K.; Gardin, A.; End, P.; Heining, P.; Bruns, C.; Cooke, G. N.; Nuesslein-Hildesheim, B. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 333-337. (f) Hongfeng Deng, H.; Bernier, G. S.; Doyle, E.; Lorusso, J.; Morgan, A. B.; Westlin, F. W.; Evindar, G. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 942-947.
80. イムセラカプセル 0.5mg錠 添付文書 田辺三菱製薬株式会社.
81. Moberly, J. B.; Rohatagi, S.; Zahir, H.; Hsu, C.; Noveck, R. J.; Truitt, K. E. *J. Clin. Pharmacol.* **2012**, *52*, 996-1006.
82. 加藤 隆一、横井 毅、山添 康：編集「薬物代謝学－医療薬学・医薬品開発の基礎として」東京化学同人出版 2010年.
83. ADMET predictor™, produced by *Simulations Plus, Inc.*
<http://www.simulationsplus.com/>
84. (a) Kohno, Y.; Kuriyama, K.; Iwanami, S.; Ando, N.; Kudou, S. EP1431284 A1, **2004**.
 (b) Yasushi, K.; Kiyooki, T.; Wataru, H.; Kazuhiko, K. EP1602660 A1, **2005**. (c) Yasushi, K.; Kiyooki, T.; Kazuhiko, K. EP1548003 A1, **2005**.

85. The agonistic activities of each compound were determined with their phosphates by measuring agonist-evoked [³⁵S]GTPγ-S binding activities to human S1P₁ and S1P₃ expressed in transfected CHO-K1 cells.
86. My modeling is based on an S1P₁ antagonist X-ray structure and the detail information is shown in the following report. Hanson, M. A.; Roth, C. B.; Jo, E.; Griffith, M. T.; Scott, F. L.; Reinhart, G.; Desale, H.; Clemons, B.; Cahalan, S. M.; Schuerer, S. C.; Sanna, M. G.; Han, G. W.; Kuhn, P.; Rosen, H.; Stevens, R. C. *Science* **2012**, 335, 851-855.
87. (a) Parrill, A. L.; Wang, D.; Bautista, D. L.; Brocklyn, J. R. V.; Lorincz, Z.; Fischer, D. J.; Baker, D. L.; Liliom, K.; Spiegel, S.; Tigyi, G. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 39379-39384. (b) Deng, Q.; Clemas, J. A.; Chrebet, G.; Hale, J. J.; Li, Z.; Mills, S. G.; Bergstrom, J.; Mandala, S.; Mosley, R.; Parent, S. A. *Mol. Pharmacol.* **2007**, 71, 724-735. (c) Schurer, S. C.; Brown, S. J.; Gonzalez-Cabrera, P. J.; Schaeffer, M.-T.; Chapman, J.; Jo, E.; Chase, P.; Spicer, T.; Hodder, P.; Rosen, H. *ACS. Chem. Biol.* **2008**, 486-498.
88. Schrödinger, LLC, New York, NY, **2011**.

論文目録

1. Enzymatic desymmetrization of 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol
Takashi Tsuji, Yukiko Iio, Toshiyasu Takemoto and Takahide Nishi, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2005**, *16*, 3139-3142.
2. Synthesis of a chiral phosphonium salt for the preparation of α -substituted alaninol derivatives
Takashi Tsuji, Tsuyoshi Nakamura, Keisuke Suzuki and Takahide Nishi, *Tetrahedron*, **2014**, *70*, 5234-5241.
3. Practical phosphorylation methods of α,α -disubstituted α -amino alcohol derivatives
Takashi Ohnuki, Takashi Tsuji, Shojiro Miyazaki, Taku Moriguchi and Takahide Nishi, *Synlett*, **2009**, *6*, 910-912.
4. Synthesis and SAR studies of benzyl ether derivatives as potent oral active S1P₁ agonists
Takashi Tsuji, Keisuke Suzuki, Tsuyoshi Nakamura, Taiji Goto, Yukiko Sekiguchi, Takuya Ikeda, Takeshi Fukuda, Toshiyasu Takemoto, Yumiko Mizuno, Takako Kimura, Yumi Kawase, Futoshi Nara, Takashi Kagari, Takaichi Shimozato, Chizuko Yahara, Shinichi Inaba, Tomohiro Honda, Takashi Izumi, Masakazu Tamura and Takahide Nishi, *Bioorg. Med. Chem.*, **2014**, *22*, 5246-5256.

参考論文目録

1. Allylation of carbonyl compounds with allylic gallium reagents
Takashi Tsuji, Shin-ichi Usugi, Hideki Yorimitsu, Hiroshi Shinokubo, Seijiro Matsubara and Koichiro Oshima, *Chem. Lett.*, **2002**, *31*, 2-3.
2. Cobalt-catalyzed coupling reaction of alkyl halides with allylic grignard reagents
Takashi Tsuji, Hideki Yorimitsu and Koichiro Oshima, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, *41*, 4137-4139.
3. Synthesis of cyclopropanes via iodine-magnesium exchange between 3-iodomethyl-1-oxacyclopentanes and organomagnesium reagents
Takashi Tsuji, Tomoaki Nakamura, Hideki Yorimitsu, Hiroshi Shinokubo and Koichiro Oshima, *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 973-978.
4. Cobalt-catalyzed cross-coupling reactions of alkyl halides with allylic and benzylic Grignard reagents and their application to tandem radical cyclization/cross-coupling reactions
Hirohisa Ohmiya, Takashi Tsuji, Hideki Yorimitsu and Koichiro Oshima, *Chemistry*, **2004**, *10*, 5640-5648.
5. Asymmetric synthesis of α,α -disubstituted α -amino alcohol derivatives
Tsuyoshi Nakamura, Takashi Tsuji, Yukiko Iio, Shojiro Miyazaki, Toshiyasu Takemoto, Takahide Nishi, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2006**, *17*, 2781-2792.

謝辞

本論文作成および発表にあたり、懇切丁寧なご指導ならびにご鞭撻を賜りました東京薬科大学薬学研究科 薬品化学教室教授 林 良雄 先生に深く感謝の意を表します。

また、本論文に関して審査およびご指導とご助言を賜りました東京薬科大学大学院薬学研究科 薬化学教室教授 三浦 剛 先生、分子機能解析学教室教授 横松 力 先生、薬品製造学教室教授 松本 隆司 先生に厚く御礼申し上げます。

本研究は筆者が三共株式会社 化学研究所所属中、現第一三共インド CEO 西剛秀 博士の指導のもとで行われたものであり、研究遂行にあたり、終始ご指導ならびにご鞭撻を賜りましたことを深く感謝いたします。

本研究の発表の機会を与えていただき、ご指導、ご支援を賜りました、第一三共株式会社 創薬化学研究所第4Gグループ長 高橋 寿 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、貴重な御指導、御助言をいただきました、第一三共株式会社 創薬化学研究所 中村 毅 博士、鈴木 啓介 博士、竹元 利泰 博士に深く感謝いたします。

本論文の作成にあたり、様々な面でご指導を賜りました、第一三共株式会社 創薬化学研究所 小林 慶行 博士、窪田 秀樹 博士に深くお礼申し上げます。

本研究の合成研究に御協力いただいた、第一三共株式会社 創薬化学研究所 宮崎正二郎 博士、池田 拓也 博士、関口 幸子 博士、福田 剛 氏、後藤 泰治 博士、水野 由美子 氏に心から感謝いたします。

本研究の X 線構造解析を実施していただきました、第一三共 RD ノバーレ株式会社 生物評価研究部 木村 貴子 氏、薬物動態面でご協力していただきました、第一三共株式会社 薬物動態研究所 箭原 千鶴子 氏、稲葉 真一 博士、本田 友博 博士、泉 高司 博士、薬効評価を担当していただきました、バイオ創薬研究所 田村 正和 博士、循環代謝研究所 川瀬 由美 氏、奈良 太 博士、先端医薬研究所 明松 隆志 博士、下里 隆一 博士に心よりお礼申し上げます。

また、化学の素晴らしさをご教示頂くと共に、筆者が化学者、研究者として生きていくきっかけを作ってくくださった京都大学大学院 大罵 幸一郎 先生、依光 英樹 先生に深く感謝いたします。

最後に、本論文の作成に際し、常に暖かく見守り、陰ながら支援してくれた最愛の妻 恵子と、両親に心から感謝いたします。