

新規臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター
(SARMs) の合成と生物活性

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（生物工学）学位論文

合川 勝二

目次

略語表	i
要旨	iv
第一章 序論.....	1
第二章 1-(4-シアノ-1-ナフチル)-2,3-ジ置換-ピロリジン誘導体の最適化研究.....	4
2.1 化合物デザイン.....	4
2.2 合成.....	5
2.3 生物評価の結果と考察.....	10
2.3.1 AR 親和性、及びレポータージーンアッセイ	10
2.3.2 <i>In vivo</i> モデルにおける臓器選択性 (3-week-old immature rats)	13
2.3.3 性行動惹起試験.....	14
2.3.4 化合物 17j の臓器移行性.....	15
2.4 結論.....	16
第三章 臨床候補化合物 4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体 20f の 創製.....	17
3.1 化合物デザイン.....	17
3.2 合成.....	20
3.3 生物評価の結果と考察.....	30
3.3.1 AR 親和性、及びレポータージーンアッセイ	30

3.3.2	<i>In vivo</i> モデルにおける臓器選択性	3 3
3.3.3	性行動惹起試験	3 6
3.3.4	薬物動態	3 7
3.3.5	核内受容体選択性	3 8
3.3.6	毒性評価	3 9
3.3.7	AR リガンド結合領域と化合物 20f との共結晶構造解析	3 9
3.3.8	臓器選択性に関する考察	4 0
第四章 総括		4 7
実験項		4 9
引用文献と注釈		1 0 7
サポーティングインフォメーション		1 1 4
本論文に関わる研究業績		1 3 1
謝辞		

略語表

本論文中に使用した略語・略号を以下に記した。

略語・略号	正式名称
AcOH	acetic acid
AR	androgen receptor
Arg	arginine
ART	androgen replacement therapy
Asn	asparagine
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butyl dicarbonate
bid	bis in die
Cbz	benzyloxycarbonyl
CCDC	The Cambridge Crystallographic Data Center
CDI	<i>N,N'</i> -carbonyldiimidazole
CNS	central nerve system
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
DHEA	dehydroepiandrosterone
DHT	dihydrotestosterone
DIEA	diisopropylethylamine
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
ESI	electrospray ionization

Et	ethyl
Et ₃ N	triethylamine
Et ₂ O	diethyl ether
EtOAc	ethyl acetate
EtOH	ethanol
Gln	glycine
h	hour
HSP	heat shock protein
HTS	high throughput screening
IPE	diisopropyl ether
iv	intravenous
LBD	ligand binding domain
Leu	leucine
LOH	late onset hypogonadism
L-Selectride [®]	lithium tri- <i>s</i> -butylhydroborate
Meldrum's acid	2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione
MeOH	methanol
Met	methionine
Me	methyl
mp	melting point
MS	mass spectrometry
NIS	<i>N</i> -iodosuccinimide
NMP	<i>N</i> -methylpyrrolidone
NOE	nuclear Overhauser effect

BuLi	butyllithium
PDB	protein data bank
Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)
PIAS	protein inhibitor of activated STAT
<i>i</i> -Pr ₂ NH	diisopropylamine
<i>i</i> -PrOH	isopropanol
Phe	phenylalanine
po	per os
qd	quaque die
SARM	selective androgen receptor modulator
sc	subcutaneously
SERM	selective estrogen receptor modulator
TBAF	tetrabutylammonium fluoride
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TBSOTf	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl trifluoromethanesulfonate
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
Thr	threonine
TP	testosterone propionate
Trp	tryptophane
Xantphos	4,5-bis(diphenylphosphino)-9,9-dimethylxanthene

要旨

ハイポゴナディズム、サルコペニア、カケクシアの治療薬開発を指向して、臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター（SARMs）のデザイン、合成、及び生物学的評価を行った。SARMs は筋肉や中枢（CNS）に対してはアゴニスト作用を示す一方、前立腺には作用しない、もしくはアンタゴニスト作用を示す。

第二章ではアンドロゲン受容体 (AR) 親和性を指標にしたハイスループットスクリーニングで見いだされた化合物をリードとし、AR とのドッキングモデルスタディーから得られた情報を基に構造最適化研究を行った。合成した化合物の中で、1-4-(シアノ-1-ナフチル)-2,3-ジ置換-ピロリジン誘導体 **17h**, **17m**, **17j** が、*in vitro* で高い AR アゴニスト活性を示した。また、これら化合物は用量依存的に肛門挙筋重量を増やす一方、前立腺及び精嚢腺には影響を与えないことから、*in vivo* で良い臓器選択性を示すことが明らかとなった。さらにこれら化合物は性行動惹起試験において性行動を惹起し、中枢 (CNS) に対しても *in vivo* でアゴニスト作用があることが示された。

第三章では、4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体の最適化を行った。SARM 化合物として既に報告されている **19a** の誘導体研究を行ったところ、Buchwald 反応を用いて合成した 4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体 **20a** が、強い AR 親和性とともにより高い代謝安定性を示すことを見出した。この情報を基に、AR アゴニスト活性を増強するため、5-オキソピロリジン環上置換基の変換を行った。その結果、化合物 **20a** から 100 倍以上アゴニスト活性を向上させた化合物の合成に成功した。さらに幼若ラットを用いた *in vivo* 試験を行った結果、以下に挙げる 3 種類の異なるプロファイルを示す化合物を見出した。

- (1) 前立腺に対するアンタゴニスト作用 . . . (20c)
- (2) 筋肉に対してはアゴニスト作用を示し、前立腺に対しては無作用

・・・(20n,d,e,f)

(3) 筋肉及び前立腺両者に対してアゴニスト作用 ・・・(20l)

薬物動態／毒性プロファイルを基に、これら化合物の中から化合物 **20f** を選択し、成獣ラットを用いた試験を行った。その結果、化合物 **20f** は用量依存的に肛門挙筋重量を増加させ、且つ前立腺重量に影響を与えないことが示された。また化合物 **20f** は、性行動惹起試験において中枢性アゴニスト作用を示すことが確認された。さらに化合物 **20f** はラット、サル、イヌ、いずれにおいても種差なく良好な *in vitro* 代謝安定性、及び薬物動態を示した。これらの結果は、ヒトにおいても良好な血中濃度が期待できることを示唆している。また **20f** は高い核内受容体選択性を示すとともに、毒性試験において十分な安全性マージンを示した。更に **20f** と AR のリガンド結合ドメインとの共結晶構造解析の結果から、合成戦略立案時の仮説が正しいことを証明した。

臓器選択性の原因を究明するため、**17j** の臓器移行性を検討した。その結果、**17j** の化合物濃度は脳＞血漿＝前立腺＞肛門挙筋であり、臓器移行性が臓器選択性の原因ではないことが確認された。臓器選択性の理由の一つとして、SARM がパーシャルアゴニストであり、PIAS1 等のコファクターをリクルートする能力がフルアゴニストとは異なることが挙げられる。パーシャルアゴニスト及びフルアゴニストと AR リガンド結合部位との共結晶構造解析を比較した結果、結合様式、温度因子共に、その差はほとんど無かった。これは、固定された共結晶では観察されない、動きのあるタンパクとの結合様式の違いが、コファクターをリクルートする能力に影響があることを示唆している。

現在、化合物 **20f** を用いた臨床応用検討が続けられており、今後の開発が期待される。

第一章 序論

ステロイドホルモンは、様々な生理的作用を引き起こす重要なケミカルメッセンジャーである^{1,3}。ステロイドホルモンの一つであるアンドロゲンは、C19 ステロイドホルモンの総称であり⁴、骨格筋の増加、骨形成の促進、赤血球の産生、及び性欲の維持をアンドロゲン受容体 (AR) との相互作用を通して行っている。テストステロンは最も重要なアンドロゲンの一つであり、主にコレステロールを原料として、睾丸及び副腎において合成される⁵。テストステロンは、さらに前立腺で 5 α -リダクターゼによりジヒドロテストステロン (DHT) に変換される。DHT は天然に存在するアンドロゲンの中で、最も強い AR アゴニスト活性を示す^{6,7}。

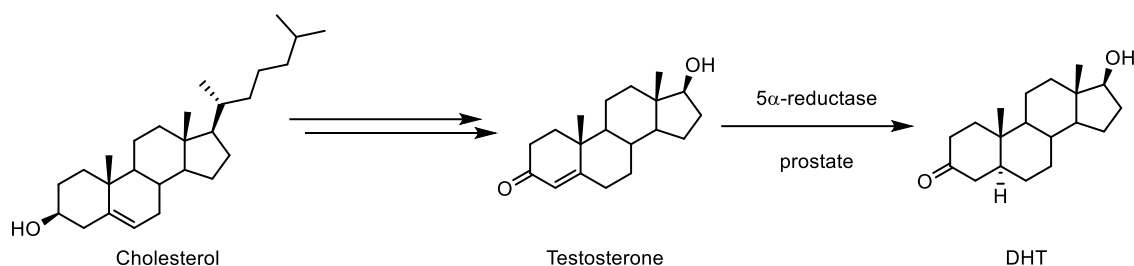


Figure 1. Testosterone Synthesis

リガンド非存在下、AR は細胞質内の heat shock protein (HSP) 70 及び HSP90 の作用により、不活性コンフォメーションを取っている⁸。リガンドが結合することにより、C-末端ヘリックス 12 が、リガンドバインディングポケットを閉じるようにシフトする。このコンフォメーション変化が HSP の乖離を誘導し、AR のホモダイマー化を引き起こす。更には、ヘリックス 3 及び 5 が中心となり、連続したコンフォメーション変化が起こる。これら構造変換がコリプレッサーを乖離させ、AR ホモダイマーは核内へ移行する。ホモダイマーはアンドロゲン応答遺伝子のプロモーター領域にある、アンドロゲン応答因子に結合する。このようにして活性化された AR は、コレギュレーター及び基本転写因子をリクルートすることで、標的遺伝子の転写を活性化もしくは抑制する^{1,6}。

精巣機能障害や視床下部異常⁹はテストステロンレベルの低下を引き起こす。視床

下部異常は、加齢 (late on set hypogonadism, LOH)¹⁰、及び癌¹¹や慢性閉塞性肺疾患 (COPD)¹²による悪液質が原因とされる。テストステロンレベルの低下は、筋肉量や体重の減少、骨粗鬆症、うつや精力減退など、様々な症状に関与している¹³⁻¹⁵。最近行われたいくつかの臨床試験において、アンドロゲン補充療法 (androgen replacement therapy, ART) が、徐脂肪体重増加と脂肪組織の減少に効果があったと報告されている^{16,17}。しかしながら ART の使用は、潜在的な副作用、すなわち前立腺肥大症や前立腺がんの懸念から制限されている。更にテストステロンは肝臓での代謝により消失するため、経口投与が出来ず、結果として筋肉注射や外科的な移植、もしくはパッチやジェルによる経皮投与に頼るしかないのが現状である¹⁸。アンドロゲン作用を有する合成ステロイドは経口投与可能であるが、その肝毒性により長期的な治療は難しい^{19,20}。

このような状況下、非ステロイド性、経口投与可能な臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター (selective androgen receptor modulators, SARMs) が、ART に代わる新たな治療薬として注目されている^{11,21-23}。SARMs のコンセプトは、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (selective estrogen receptor modulators, SERMs)²⁴ に由来する。SERMs は閉経後の女性に対するエストロゲン補充療法として 20 年以上使用されている。SARMs は筋肉や中枢に対してはアゴニスト作用を示す一方、前立腺に対しては作用しないことが期待される。非ステロイド性の SARMs は経口投与可能な安全性の高い薬剤として、ART に置き換わる可能性がある。

既に、幾つかの非ステロイド性 SARMs が臨床試験に入っている； Ostarine (GTx/Merck)^{25,26}, BMS569429 (Bristol Myers Squibb)²⁷, LGD2941 (Ligand)²⁸, VK-5211 (Viking Therapeutic, structure not disclosed)²⁹, GSK-2881078 (GlaxoSmithKline)³⁰, DT-200 (Akashi Therapeutic)³¹⁻³³。特に Ostarine は Phase II において、癌悪液質患者の徐脂肪体重増加と筋肉作用の改善を示した。しかしながら SARMs として、それ以上の開発は報告されておらず (原因非開示)、現在は AR 反応性トリプルネガティブ乳がんに対して

臨床試験が行われている。

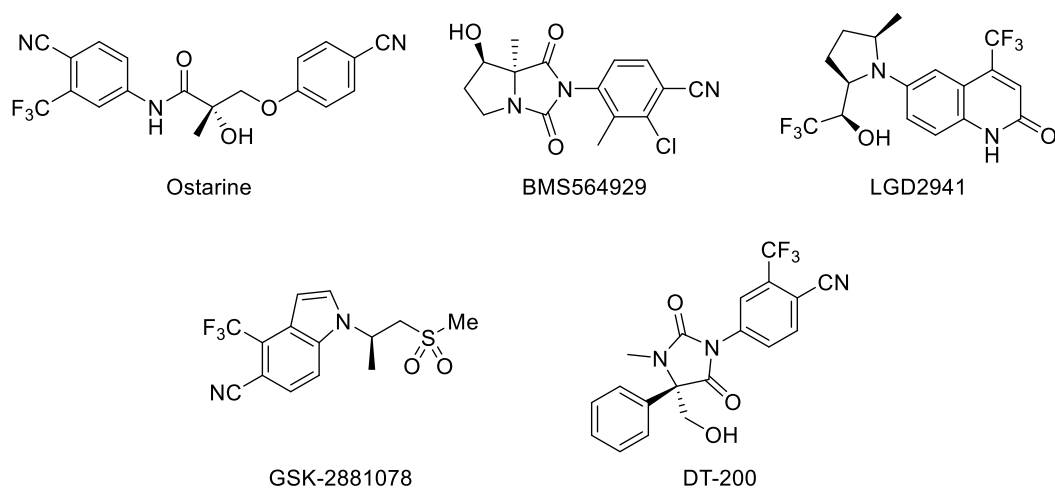


Figure 2. Known nonsteroidal SARMs.

本論文においては二つの新規 SARM、1-(4-シアノ-1-ナフチル)-2,3-ジ置換-ピロリジン誘導体（第二章）、及び 4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体（第三章）の開発、評価、及び SARM 化合物の臓器選択性について報告する。

第二章 1-(4-シアノ-1-ナフチル)-2,3-ジ置換-ピロリジン誘導体の最適化研究

2.1 化合物デザイン

新規 SARM 化合物の合成研究は、high-throughput screening (HTS) によって同定された 1-(4-ニトロ-1-ナフチル)ピロリジン (化合物 A) をリードとして開始された。化合物 A は強い AR 結合親和性 ($IC_{50} = 2.4$ nM) と中程度の AR アゴニスト活性 ($EC_{50} = 41$ nM) を示した。化合物 A と AR LBD との結合様式を、Gold (ver.1.1, Cambridge Crystallographic Data Center, Cambridge, UK) を用いたドッキングモデルスタディーにより検証した (Figure 3)。ドッキングモデルスタディーは、Protein Data Bank (PDB) 格納データではなく in house data を用いた。この検討から二つのカギとなる相互作用の存在が示唆された。一つ目はナフタレン環 4 位のニトロ基と Arg752 との水素結合であり、二つ目は Leu707, Leu873, Met745, Met749, Met787, Phe764 とナフタレン環との脂溶性相互作用である。また、ピロリジン環 2 位付近に Trp741, Met742 及び Met745 からなる脂溶性ポケットが存在し、3 位周辺に Asn705 と Thr877 からなる水溶性ポケットがあることが示唆された。これら情報を基に下記 3 つの合成戦略を立てた。

- (1) ナフタレン環 4 位ニトロ基を、水素結合能を有する低毒性置換基 (X) に変換する
- (2) ピロリジン環 2 位付近の脂溶性ポケットに結合する脂溶性置換基 (R^1) を導入する
- (3) ピロリジン環 3 位に Asn705 及び Thr877 と水素結合する極性置換基 (R^2) を導入する。

本章では、1-(4-シアノ-1-ナフチル)-2,3-ジ置換-ピロリジン誘導体のデザイン、合成及び *in vitro*、*in vivo* 試験結果について報告する。

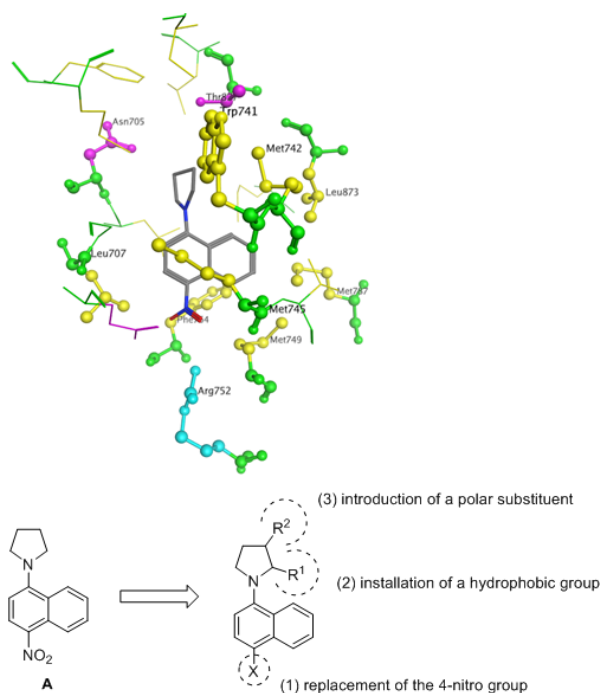
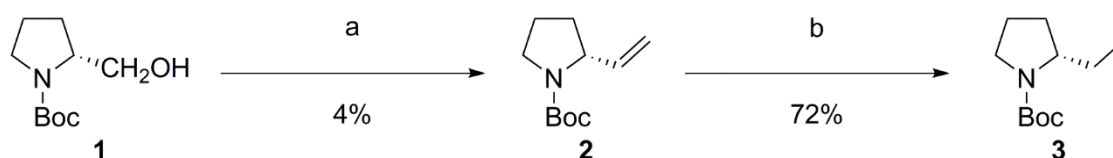


Figure 3. Docking study of compound **A** with the LBD of AR and the design of more potent agonists.

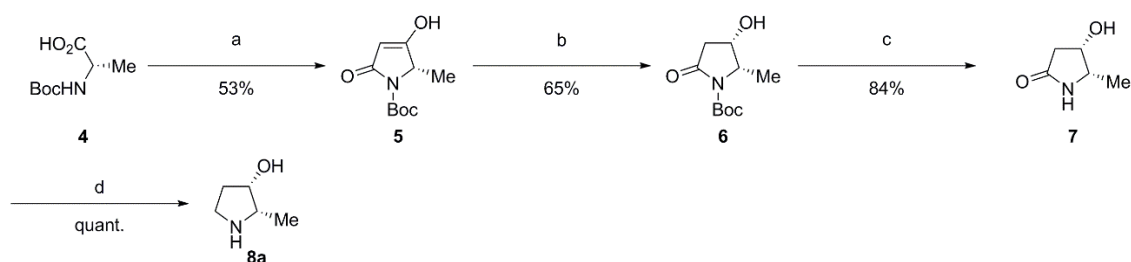
2.2 合成

ピロリジン **3,8a-c** は Scheme 1-3 に従って合成した。2-(*S*)-ビニルピロリジン **2** は、市販の 2-(*S*)-ヒドロキシメチルピロリジン **1** を酸化した後、臭化メチルトリフェニルホスホニウムを用いた Wittig 反応により合成した。更に水素添加反応を行い、2-(*S*)-エチルピロリジン **3** を 72%の収率で得た (Scheme 1)。Boc 保護された L-アラニン **4** とメルドラム酸を縮合した後、酢酸エチル中、還流条件下で環化させることにより、化合物 **5** を 53%の収率で得た。化合物 **5** を水素化ホウ素ナトリウム-酢酸と反応させることで、シス選択的還元が進行し、(2*S*,3*S*)-ピロリドン誘導体 **6** を 65%の収率で得た。Boc 基を 4M 塩酸で脱保護した後、アミド結合を Red-Al を用いて還元し、(2*S*,3*S*)-ピロリジン誘

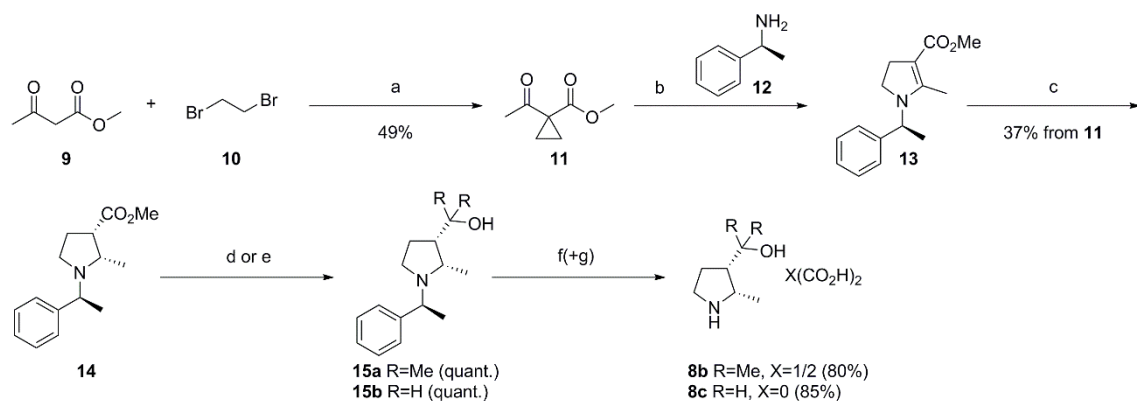
導体 **8a** を合成した (Scheme 2)。アセト酢酸メチル **9** に対して 1,2-ジブロモエタン **10** を反応させることで、シクロプロピル基を導入した化合物 **11** を 49%の収率で合成した。引き続き(*S*)-ベンジルアミン誘導体 **12** と縮合することで、ジヒドロピロール **13** を合成した。更にプラチニウムオキシド(IV)を用いて、水素雰囲気下、ジアステレオ選択的還元を行い、光学活性な(2*S*,3*S*)-ピロリジン誘導体 **14** を得た。ジアステレオ選択的還元は、化合物 **13** の(*S*)-ベンジル基により制御されている。化合物 **14** は臭化メチルマグネシウム、もしくは水素化アルミニウムリチウムと反応させることで、それぞれ **15a,c** へと変換した。更にパラジウムカーボンを触媒とした水素添加反応によりベンジル基を除去し、光学活性なピロリジン誘導体 **8b,c** を得た (Scheme 3)。



Scheme 1. Reagents: (a) (1) $\text{SO}_3\text{-Py}$, Et_3N , DMSO, (2) Ph_3PMeBr , NaH, DMSO; (b) H_2 , Pd-C, MeOH

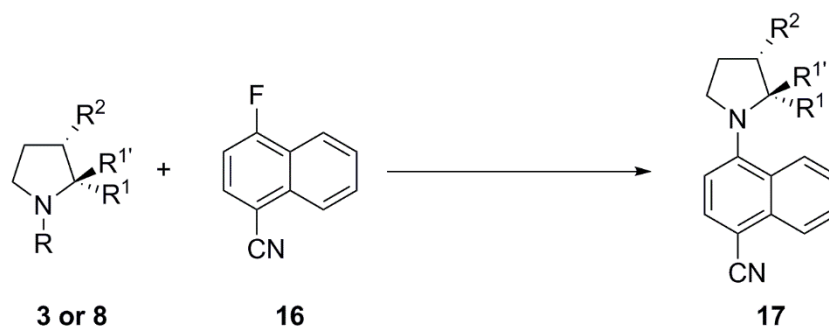


Scheme 2. Reagents: (a) (1) Meldrum's acid, CDI, CH_2Cl_2 , (2) AcOEt, reflux; (b) NaBH_4 , AcOH, CH_2Cl_2 ; (c) (1) 4M HCl-AcOEt, (2) Amberlyst A-21, MeOH, (3) recryst. from IPE; (d) Red-Al, THF.



Scheme 3. Reagents: (a) K_2CO_3 , acetone; (b) **12**, TsOH, toluene, reflux; (c) H_2 , PtO_2 , MeOH; (d) $MeMgBr$, THF, Et_2O , $-78\text{ }^\circ\text{C}$; (e) LAH, THF; (f) H_2 , Pd-C, MeOH; (g) $(CO_2H)_2$, MeOH

ピロリジン誘導体 **3** 及び **8** と、4-フルオロナフトニトリル **16** とのカップリング反応を、炭酸カリウムもしくは炭酸リチウムを塩基とし、ジメチルスルホキシド中 $100\text{ }^\circ\text{C}$ で行い、4-ピロリジノナフトニトリル誘導体 **17a-k** を得た (Scheme 4)。Boc もしくはベンジル保護されたピロリジンは、酸もしくは水素添加により脱保護した後、カップリング反応に用いた。**8b-d,f,g,k** は市販されている化合物を用いた。



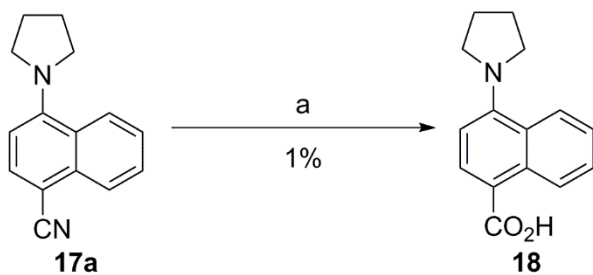
Compd.	R ¹	R ^{1'}	R ²	R	Methods	Yield (%)
17a	H	H	H	H	e	91
17b	Me	H	H	Boc	a + e	49
17c	H	Me	H	H	e + f	45
17d	Me	Me	H	Bn	c + e	3
17e	Et	H	H	Boc	b + e + f	18
17f	<i>i</i> -Pr	H	H	Bn	d + e	28
17g	CONH ₂	H	H	H	e	37
17h	Me	H	OH	H	e	65
17i	Me	H	CH ₂ OH	H	e	30
17j	Me	H	C(Me) ₂ OH	H*	e**	73
17k	Me	H	CO ₂ Me	Bn	c + e	22

*1/2 (CO₂H) salt, **Li₂CO₃ was used instead of K₂CO₃.

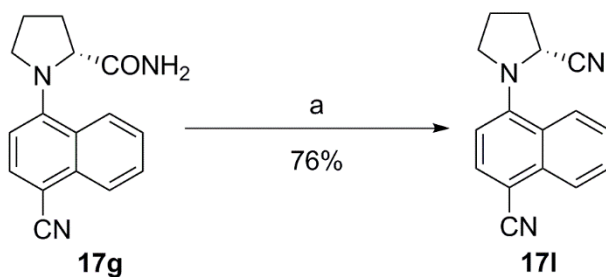
Scheme 4. Methods: (a) TFA, toluene; (b) HCl, EtOAc; (c) H₂, Pd-C, MeOH, HCl; (d) H₂, Pd-C, MeOH, AcOH (e) K₂CO₃, DMSO; (f) Chiral HPLC.

化合物 **17a** のシアノ基は、炭酸カリウムにより加水分解し、カルボン酸 **18** へ 1%の収率で変換した (Scheme 5)。化合物 **17g** のカルバモイル基は、トリフルオロ酢酸無水物を用いた脱水反応を行うことでシアノ基へと変換し、**17i** を 76%の収率で得た (Scheme

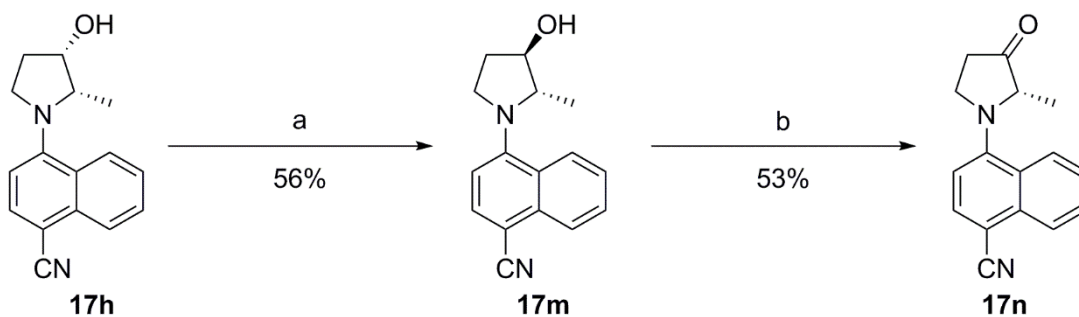
6)。光学活性な(2*S*,3*R*)-ピロリジン誘導体 **17m** は、(2*S*,3*S*)-ピロリジン誘導体 **17h** に対して光延反応を行い、更に加水分解を行うことで得た。また **17m** に対しスワン酸化反応を行うことにより、3-オキソ体 **17n** を 53%の収率で得た。



Scheme 5. Reagents: (a) KOH, EtOH, H₂O, reflux.



Scheme 6. Reagents: (a) TFAA, Et₃N, CH₂Cl₂.



Scheme 7. Reagents: (a) (1) 3,4-dimethoxybenzoic acid, Ph₃P, DEAD, THF, toluene, (2) NaOHaq, THF, MeOH, H₂O; (b) DMSO, (COCl)₂, Et₃N, CH₂Cl₂.

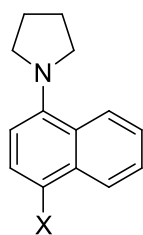
2.3 生物評価の結果と考察

2.3.1 AR 親和性、及びレポータージーンアッセイ

AR 親和性は放射性標識された $[^3\text{H}]$ mibolerone と化合物の置換で評価し、 IC_{50} でその活性を示した。また機能活性はルシフェラーゼ活性で決定し、 EC_{50} として示した。

まず、リード化合物 **A** のニトロ基を、水素結合能を有する他置換基へ変換する検討を行った (Table 1)。カルボキシル基への変換 (**18**) は、AR 親和性が大きく減弱する結果となった。これに対して、シアノ基に変換した化合物 **17a** は結合親和性を維持し、且つ **A** と比較してアゴニスト活性が 15 倍向上した ($\text{EC}_{50} = 2.5 \text{ nM}$)。

Table 1. In vitro activities of **18**, **17a**, and **A**



Compd.	X	AR binding ^a	AR reporter ^a
		$\text{IC}_{50} \text{ (nM)}^b$	$\text{EC}_{50} \text{ (nM)}^b$
18	CO_2H	>10,000	-
17a	CN	2.5	2.5
A	NO_2	2.5	41

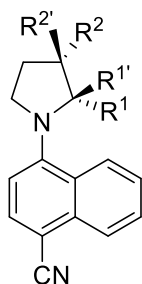
^a Human AR was used.

^b IC_{50} and EC_{50} values shown are the mean values of duplicate measurements.

以上の知見を基に、置換基 **X** をシアノ基に固定し、ピロリジン環上の置換基変換を行った。まず、ピロリジン環 2 位の置換基を検討した (Table 2)。(S)-メチル基を導入した化合物 **17b** ではアゴニスト活性が 10 倍向上したが ($\text{EC}_{50} = 0.19 \text{ nM}$)、(R)-メチル

基を導入した **17c** ではアゴニスト活性が大きく減弱した。この結果は、アンドロゲン受容体が、(S)-配座を明確に認識していることを示唆している。そこで 2 位置換基を(S)-配座に固定し、置換基の大きさについて検討した。(S)-エチル体 **17e** は、(S)-メチル体 **17b** と同等のアゴニスト活性を示した。一方、ジメチル体 **17d**、イソプロピル体 **17f** ではアゴニスト活性が減弱する結果となった。これらの結果はピロリジン環 2 位周辺のポケットは小さいことを示している。更に極性置換基であるカルバモイル基 (**17g**)、シアノ基 (**17l**) を導入したが、アゴニスト活性が低下した。このことから、ピロリジン環 2 位周辺のスペースが脂溶性であることを示唆された。

次に、ピロリジン環 3 位置換基 (R^2, R^3) の効果を検討した。(S)-OH 体 (**17h**)、(R)-OH 体 (**17m**) とともに、強いアゴニスト活性を保持した。一方、3-オキソピロリジン誘導体 **17n** は、3 位無置換体 **17b** と比べて活性が減弱した。このことから、ピロリジン環 3 位の水素供与基が、アゴニスト活性に影響を持つことが示唆された。ヒドロキシル基 (**17h**) を、ヒドロキシメチル基へと変換した **17i** では活性が 5 倍減弱し、更にジメチル基を導入した **17j** では 38 倍活性が減弱する結果となった。このことから、アゴニスト活性にはヒドロキシル基の水素供与能だけではなく、その置換基の大きさが重要であることが示された。水素結合能を有さず、且つ大きいメトキシカルボニル基を導入した **17k** においては大きく活性が減弱する結果となった。

Table 2. Effect of substitutions on the pyrrolidine ring

Compd.	R ¹	R ^{1'}	R ²	R ^{2'}	AR binding ^a	AR reporter ^a
					IC ₅₀ (nM) ^b	EC ₅₀ (nM) ^b
17b	Me	H	H	H	0.84	0.19
17c	H	Me	H	H	20	>1,000
17d	Me	Me	H	H	7	21
17e	Et	H	H	H	1.1	0.24
17f	<i>i</i> -Pr	H	H	H	1.4	2
17g	CONH ₂	H	H	H	34	21
17l	CN	H	H	H	1	160
17h	Me	H	OH	H	2.2	0.25
17m	Me	H	H	OH	2.4	0.32
17n	Me	H	=O		37	2.2
17i	Me	H	(<i>S</i>)-CH ₂ OH	H	4.1	1.2
17j	Me	H	(<i>S</i>)-C(Me) ₂ OH	H	1.4	45
17k	Me	H	(<i>S</i>)-CO ₂ Me	H	7.5	>1,000
17a	H	H	H	H	2.5	2.5

^a Human AR was used.^b IC₅₀ and EC₅₀ values shown are the mean values of duplicate measurements.

2.3.2. *In vivo* モデルにおける臓器選択性 (3-week-old immature rats)

In vivo モデルにおける臓器選択性は、Hershberger アッセイ³⁴を用いて評価した。本試験においては肛門挙筋重量をタンパク同化作用の指標として、前立腺及び精嚢腺重量を男性ホルモン活性の指標とした。強いアゴニスト活性を示す **17h**、**17m**、及び弱いアゴニスト **17j** を選択し、臓器選択性を検討した。これら化合物を、3 週齢の幼若 SD ラットに経口で 1 日 2 回、4 日間投与した。本試験においては、化合物と同時にテストステロンプロピオネート (TP, 0.5 mg/kg/day, sc, qd.) を投与した。これはラットでは産生されない副腎性テストステロンを補充することで、本試験をヒトに外挿することが目的である。本タイプの試験において皮下投与された TP は、前立腺と肛門挙筋に対して同等の効果を示すことが報告されている。

強いアゴニスト **17h** ($EC_{50} = 0.25$ nM) と **17m** ($EC_{50} = 0.32$ nM) は本試験において、臓器選択的作用を示した。これら化合物は肛門挙筋重量を 0.15 mg/kg (bid) から 1.5 mg/kg (bid) まで用量依存的に有意に増加させ、1.5 mg/kg (bid) においてはコントロール群と比べて 150%の重量となった。一方この 2 化合物は前立腺と精嚢腺重量に関しては、最高投与量 (それぞれ 5.0, 1.5 mg/kg) においても影響を与えなかった。弱いアゴニストである **17j** ($EC_{50} = 45$ nM) も用量依存的に肛門挙筋重量を増加させたが、0.15, 0.5 mg/kg (bid) において有意性は見られなかった。この結果は化合物 **17j** の *in vitro* profile を反映している。また化合物 **17j** は、化合物 **17h,m** と同様に前立腺及び精嚢腺重量には影響を与えなかった。本結果から、本シリーズの化合物における、SARM の *in vivo* proof-of-concept が確認された。

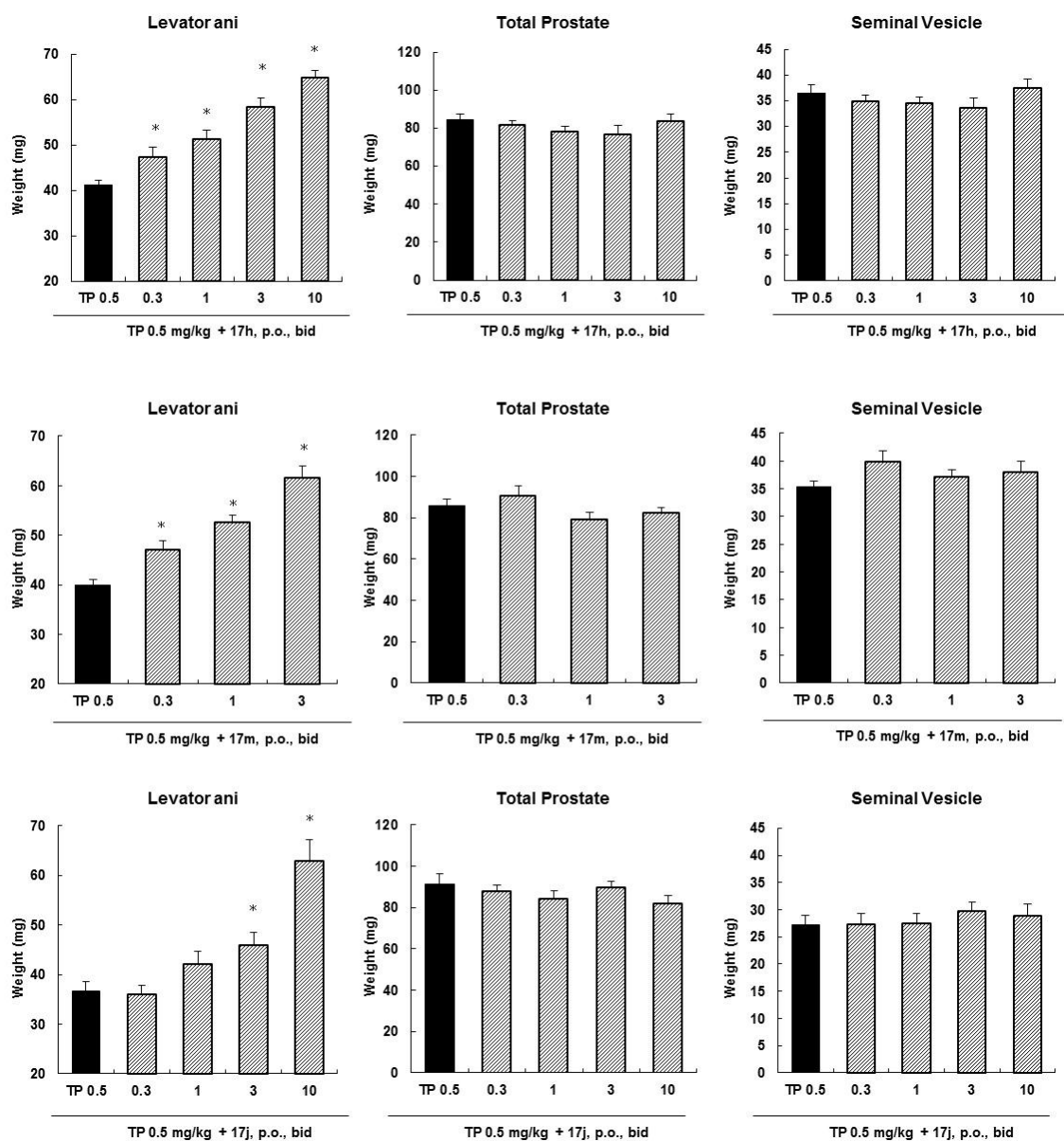


Figure 4. Tissue selectivity in vivo

* $p \leq 0.05$ (Student's t-test) when compared with the TP (0.5 mg/kg)-treated control group

2.3.3 性行動惹起試験

CNS におけるアゴニスト作用を確認するため、性行動惹起試験を行った (Table 3)。
繁殖能を有するラットを選択し、性行動を除去するために去勢を行った。化合物 **17h,m,j** を三週間投与したのち、雌ラットの偽妊娠率で性行動が惹起されているかを評価した。

化合物 **17h** (0.5 mg/kg, bid), **17m** (1.5 mg/kg, bid), **17j** (2.5 mg/kg, bid) はいずれも性行動を有意に惹起した。この結果は、これら 3 つの SARM 化合物が、CNS においてもアゴニスト作用を示すことを示唆している。

Table 3. Sexual behavior induction assay

Compound	Dose (mg/kg, bid, p.o. for 21 days)					
	0	0.5	1.5	2.5	3.5	5
17h	0	44*	70*	N.T. ^a	N.T. ^a	80*
17m	0	38	67*	N.T. ^a	N.T. ^a	67*
17j	0	N.T. ^a	N.T. ^a	57*	57*	50*

* $p \leq 0.05$ (Steel test) when compared with the vehicle-treated control group. ^a Not tested.

2.3.4 化合物 **17j** の臓器移行性

SARM 化合物の臓器選択性の理由を確認するため、**17j** を SD ラットの雄に 5 mg/kg、経口投与し、薬剤臓器移行性を調べた。その結果、**17j** の化合物濃度は脳>血漿＝前立腺>肛門挙筋であり、経時変化を追った際にも変化が無いことが分かった (Figure 5)。この結果から、**17j** が前立腺重量に影響を与えない理由は、前立腺への移行性が低い訳ではない、と考えられる。

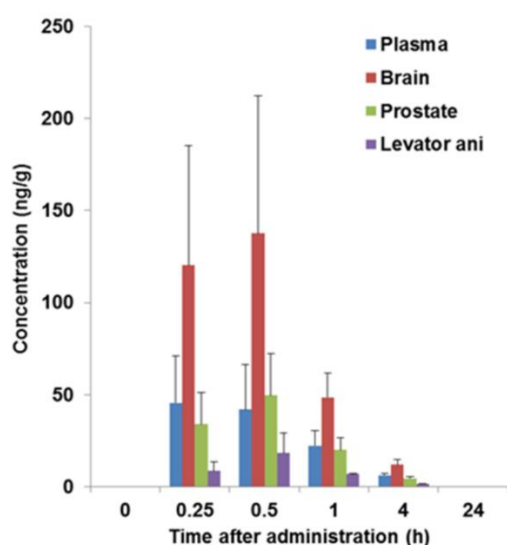


Figure 5. Tissue distribution of **17j**

2.4 結論

新規 SARM 化合物の開拓を目的として、ヒット化合物 **A** と AR のドッキングモデルスタディを基に、化合物最適化を行った。その結果、1-(4-シアノ-1-ナフチル)-2,3-ジ置換ピロリジン誘導体 **17h**, **17m**, **17j** が強い AR アゴニスト活性を有することを見出した。更に検討を続けた結果、これら化合物は Hershberger アッセイにおいて、高い臓器選択性を示すことが分かった。すなわち肛門挙筋を用量依存的に増加させる一方、前立腺及び精囊腺重量には影響を与えなかった。またこれら化合物は去勢ラットを用いた性行動惹起試験で薬効を示し、CNS においてもアゴニスト作用があることを示した。本系統化合物の更なる最適化は、次章にて報告する。

第三章 臨床候補化合物 4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体 **20f** の創製

3.1 化合物デザイン

第二章において、臓器選択性を有する SARM 化合物 (**17h,m,j**) について報告した。本研究において、ピロリジン環上置換基の探索は行ったが、合成上の難しさから、ナフタレン環の変換にまでは至らなかった。そこで我々は合成展開が容易な、4-(ピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体の合成展開をすることとした。2'-クロロ-3'-メチルベンゾニトリル誘導体 **19a**³⁵ は、**17h** と同等の活性を保持したが、代謝安定性が非常に悪く、薬物動態に問題があった (AUC=3.2 ng·h/mL、ラット)。更なる検討の結果、化合物 **19a** は、酸化に対する代謝安定性が悪い (ヒト/ラット=67/230 μL/min/mg) だけではなく、ピロリジン環上 3 位水酸基が、硫酸及びグルクロン酸により抱合を受けていることが分かった。そこで抱合による代謝を回避するため、ピロリジン環 3 位 (Z^1) にアルキル基を導入して立体障害性を高めたところ、期待通り抱合を回避し、且つ活性を維持することが分かった。しかしながら酸化代謝に対する安定性は予測が困難であったため、ピロリジン環上置換基 Z^1 、 Z^2 、及びベンゾニトリル上置換基 Z^3 の組み合わせを網羅的に合成することにより、最適化を行わざるを得なかった。その結果、筋肉重量を増加させる一方、前立腺重量には影響を与えない SARM プロファイルを有する、4-(ピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体 **19b** を見出した³⁵。しかしながら本化合物は毒性試験において十分な安全域が得られず、それ以上の開発は断念した。

そこで我々は代謝安定性の向上を目的とし、ピロリジンユニットの酸化代謝部位である 5 位をオキソ基でブロックした、4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体 **20a,b** をデザインした。SARM 研究の初期から、5-オキソピロリジン誘導体において、代謝安定性が向上されることが予想されていたが、これまで合成ルートを確認できなかった。そこで我々はパラジウム触媒を用いた Buchwald 反応を検討し、その結果

SARM 研究において初めて、5-オキソピロリジン誘導体 **20a,b** を合成することに成功した (第三章第二節、Scheme11)。これら化合物のプロファイルを確認したところ、**20a** ($\log P=1.42$)、**20b** ($\log P=1.90$) は期待通り酸化代謝に対する安定性が高く³⁶、且つピロリジン誘導体 **19a** ($\log P=2.86$) と比べて脂溶性が低いため、水酸基の抱合も起きないことが分かった。一方 **20a,b** は強い AR 結合親和性を示すものの、アゴニスト活性は十分ではなかった (Figure 6)。そこで我々は、4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体のアゴニスト活性を向上させるため、構造変換を行うこととした。4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体は、脂溶性は低いものの、4-(ピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体と構造的な類似性は高い。我々は両者の結合様式は近似しているとの仮説を立て、既に報告した化合物 **19a** と AR LBD との共結晶構造を基に、デザインを行うこととした (Figure 7)。X 線結晶構造解析の情報から、ピロリジン環付近に二つの小さな脂溶性ポケットがあることが示唆された。一つは **19a** の 2 位付近に存在する、Trp741, Met742, Met745 から構成される脂溶性ポケットであり、もう一つは Leu701, Met780, Leu873 からなり、ピロリジン環の 4 位付近に存在するポケットである。更に **19a** の研究結果から、ピロリジン環 3 位へのアルキル基導入で、活性が保持されることも明らかになっている³⁴。これらの情報を基に、**20a** のアゴニスト活性向上を指向して、5-オキソピロリジン環上置換基 (R^1 - R^5) の変換を行った。

本章では、4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体のデザイン、合成、*in vitro*、*in vivo* 活性評価、及び理想的な SARM プロファイルを有する 4-[(2*S*,3*S*)-2-エチル-3-ヒドロキシ-5-オキソピロリジン-1-イル]-2-(トリフルオロメチル)ベンゾニトリル **20f** の発見について報告するとともに、SARM 化合物の臓器選択性について考察を行う。

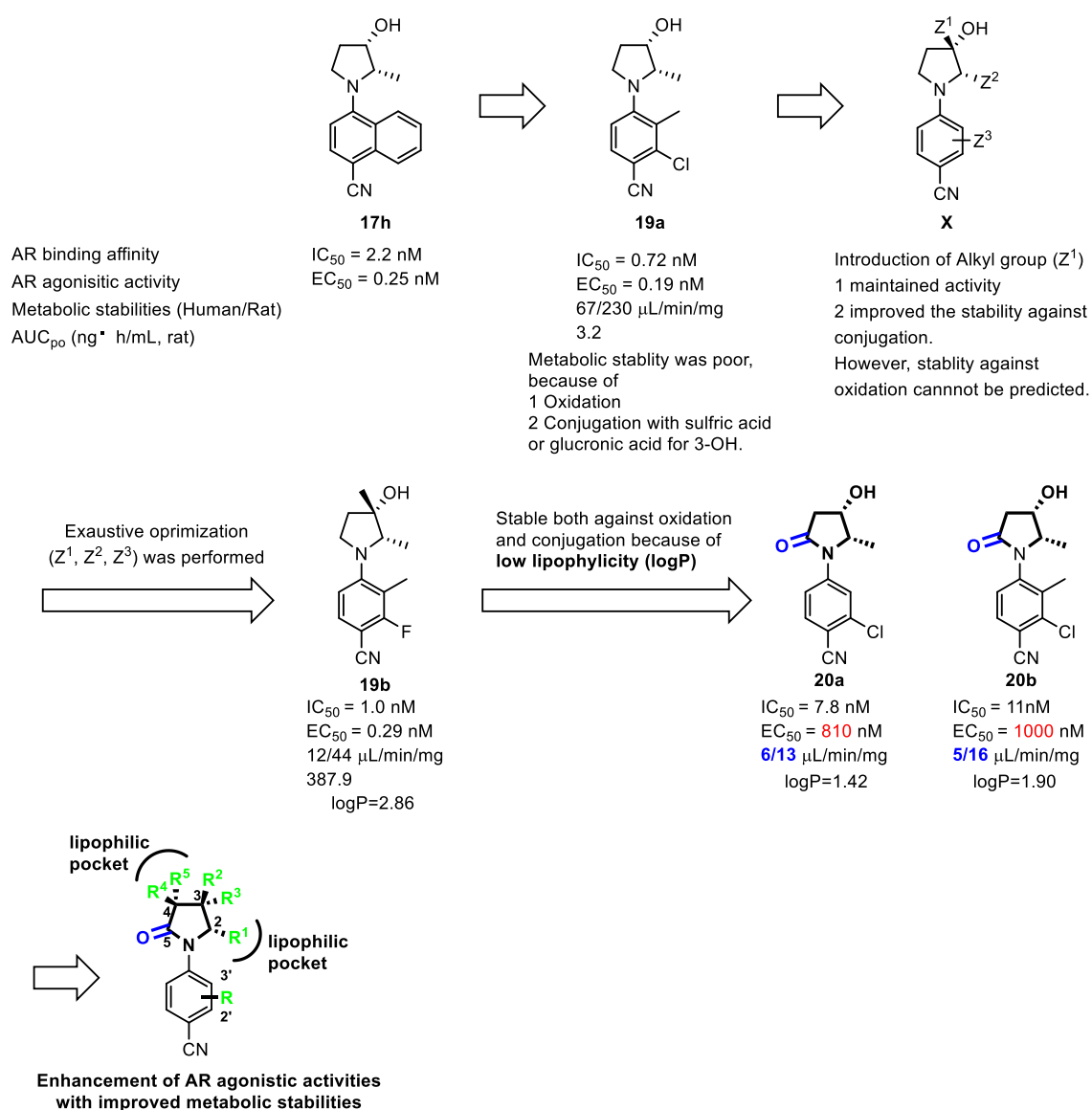


Figure 6. The design of 4-(5-oxopyrrolidine-1-yl)benzonitrile derivatives with more potent AR agonistic activities.

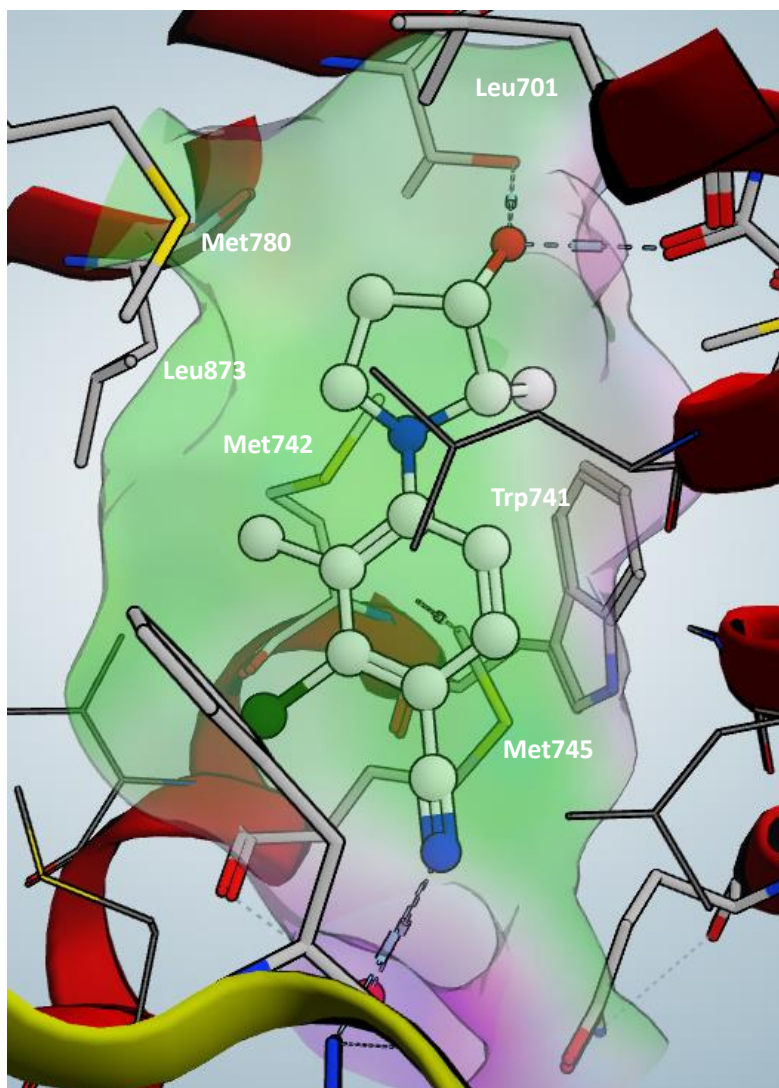
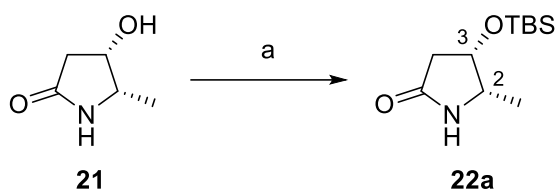


Figure 7. X-ray information of compound **19a** with the LBD of AR.

3.2 合成

TBS 保護されたピロリジン-5-オン誘導体 **22a** は、既に報告されている(2*S*,3*S*)-3-ヒドロキシ-2-メチルピロリジン-5-オン(**21**)³⁵ に対して、TBSCl とイミダゾールを作用させることで合成した (Scheme 8)。

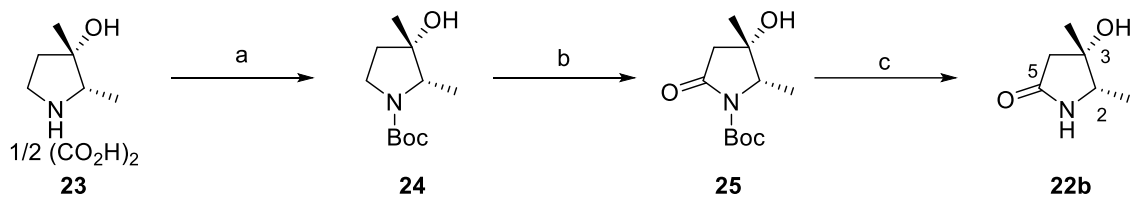
Scheme 8. Synthesis of compound **4a**^a



^aReagents and conditions: (a) TBSCl, imidazole, DMF, 74%

2,3-ジメチルピロリジン-5-オン誘導体 **22b** は、光学活性な(2*S*,3*S*)-2,3-ピロリジン-3-オール 1/2 シュウ酸塩 (**23**)^{35,37} から合成した (Scheme 9)。ピロリジン **23** を Boc 保護し 72%の収率で **24** を得た。続いて、活性化した RuO₄ と触媒量の RuO₂・H₂O 及び NaIO₄ を用いてピロリジン環の酸化を行い、化合物 **25** を 34%の収率で得た。引き続き脱保護反応を行うことで、**22b** を 94%の収率で得た。

Scheme 9. Synthesis of 2,3-dimethylpyrrolidin-5-one analog **4b**^a

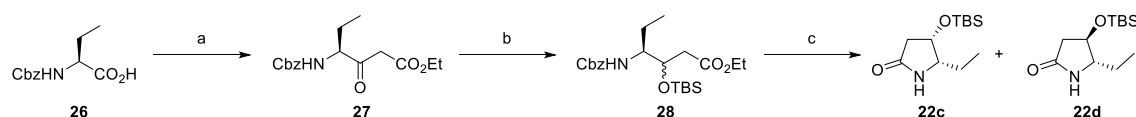


^aReagents and conditions: (a) Boc₂O, 1 M NaOH aq., THF, 72%; (b) cat. RuO₂/H₂O, NaIO₄, EtOAc/H₂O, 34%; (c) 4 M HCl in EtOAc, 94%.

化合物 **22c,d** の合成を Scheme 10 に示した。窒素を Cbz 保護した(*S*)-2-ブタン酸 **26** を CDI で活性化した後、リチウムエノレートと縮合させることで化合物 **27** を 62%の収率で得た。化合物 **27** のケトンを選択的に還元して水酸基に変換したのち、TBSOTf と

2,6-ルチジンを用いて保護し、化合物 **28** を 66% の収率で得た。Cbz 基を水素添加反応により脱保護したのち、NaOMe を用いて環化し、更にシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製することで、(2*S*,3*S*)-5-オキソピロリジン誘導体 **22c** を 13%、(2*S*,3*R*)-5-オキソピロリジン誘導体 **22d** を 59% の収率でそれぞれ得た。化合物 **22c,d** の相対配置は化合物 **20d**³⁸ の X 線結晶構造解析、**20e**³⁹ の NOE 解析からそれぞれ決定した (Figure 8)。

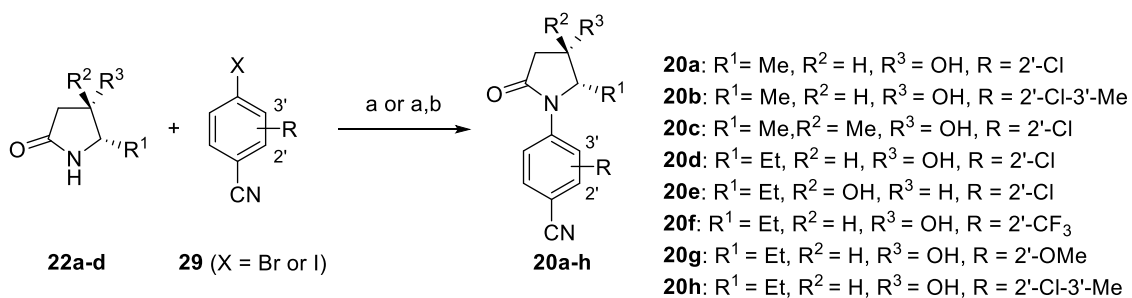
Scheme 10. Synthesis of ethyl analog **22c,d**^a



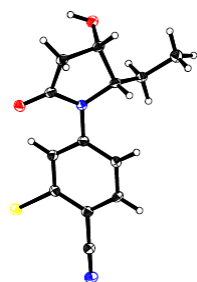
^aReagents and conditions: (a) (1) CDI, THF, (2) *n*-BuLi, *i*-Pr₂NH, EtOAc, THF, 62% for 2 steps; (b) (1) NaBH₄, MeOH, (2) TBSOTf, 2,6-lutidine, THF, 66% for 2 steps; (c) (1) Pd/C, H₂, MeOH, (2) NaOMe, MeOH, (3) Chromatographic purification by silica gel, 13% (**4c**) and 59% (**4d**) for 3 steps.

ピロリジン-5-オン誘導体 **22a-d** と 4'-ハロベンゾニトリル **29** の縮合は、Pd₂(dba)₃, Xantphos、炭酸セシウムを用いた Buchwald 反応を用いて行った。更に **22a,c,d** の場合には、TBS 基の脱保護を行い 4'-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体 **20a-h** を 6-87% の収率で得た (Scheme 11)。

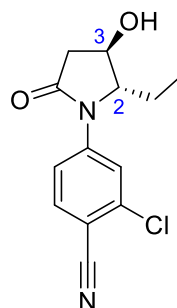
Scheme 11. Synthesis of compounds **20a–h** by Buchwald reaction^a



^aReagents and conditions: (a) Pd₂(dba)₃, Xantphos, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane; (b) HCl aq., EtOH, THF, 33–86%.



X-ray analysis of Compound **20d**³⁸

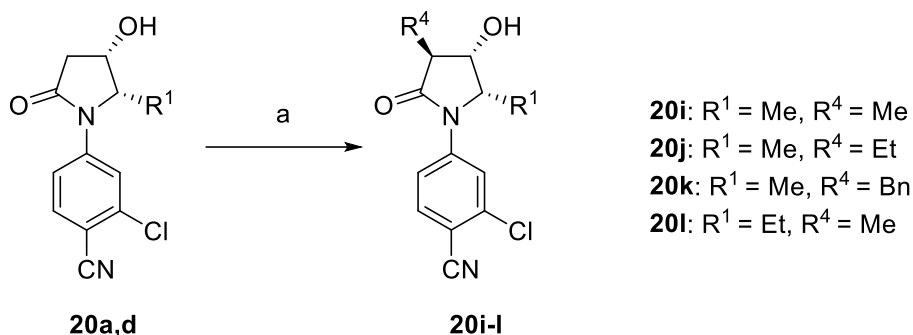


NOE analysis of Compound **20e**³⁹

Figure 8. X-ray and NOE analysis of compound **20d** and **20e** to determine the relative structure.

4-アルキル(R⁴)ピロリジン-5-オン誘導体 **20i–l** は、**20a** 及び **20d** をジリチオ化した後、選択的アルキル化を行うことで、5-42%の収率で得た (Scheme 12)。本反応の立体選択性は、ピロリジン環 3 位の水酸基との立体反発によって制御されている。化合物 **20i** の相対配置は NOE 解析により決定した (Figure 9)³⁹。

Scheme 12. Synthesis of 4-alkyl (R^4) pyrrolidine-5-one analog **20g-i**^a



^aReagents and conditions: (a) *n*-BuLi, *i*-Pr₂NH, THF then $R^4\text{Br}$ or $R^4\text{I}$, 5–42%

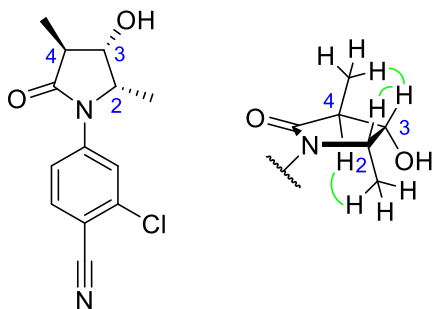
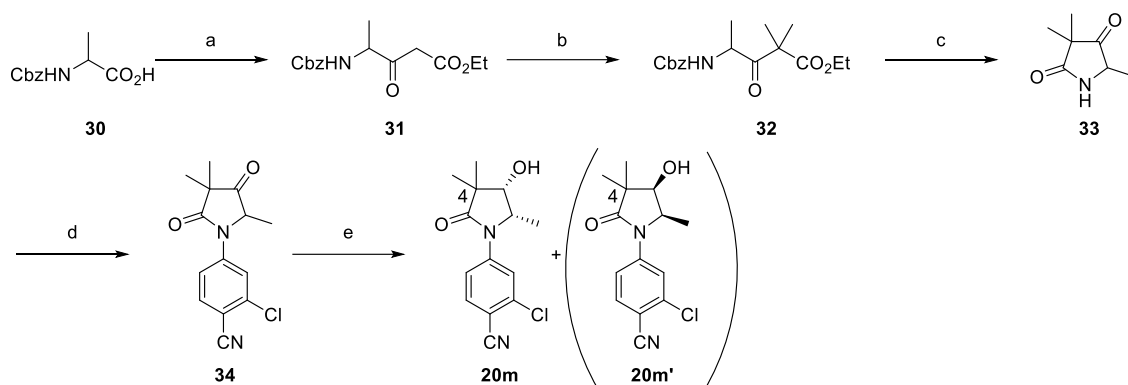


Figure 9. NOE analysis of compound **20i** to determine the relative structure.³⁹

4,4-ジメチルピロリジン-5-オン誘導体**20m**はScheme 13に従って合成した。Cbz保護されたアミノ酸誘導体**30**をCDIで活性化したのち、リチウムエノレートと縮合することで、化合物**31**を46%の収率で得た。引き続きジメチル化により**32**を85%の収率で得た後、脱保護と同時に環化反応を行い、**33**を87%の収率で得た。化合物**33**と2-クロロ-4-ブromoベンズニトリルとをBuchwald反応を用いて縮合し、**34**を53%の収率で得た。L-Selectride®を用いて化合物**34**のシス選択的還元を行った後、Chiral HPLCを用いて分離精製し、**20m**を32% (99.9% *ee*)、**20m'**を34% (99.5% *ee*) で得た。**20m**の相対立体配置はNOE解析で³⁹、絶対立体配置は結合阻害活性、アゴニスト活性を基に決定した⁴⁰。

Scheme 13. Synthesis of 4-dimethyl analog **20m**^a



^aReagents and conditions: (a) (1) CDI, THF, (2) *n*-BuLi, *i*-Pr₂NH, EtOAc, THF, 46%; (b) MeI, K₂CO₃, acetone, 85%; (c) Pd/C, H₂, MeOH, 87%; (d) 4-bromo-2-chlorobenzonitrile, Pd₂(dba)₃, Xantphos, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane, 53%; (e) (1) 1.0 M L-Selectride[®] (2) Chiral HPLC purification, 32% for **2m** and 34% for **2m'**, respectively.

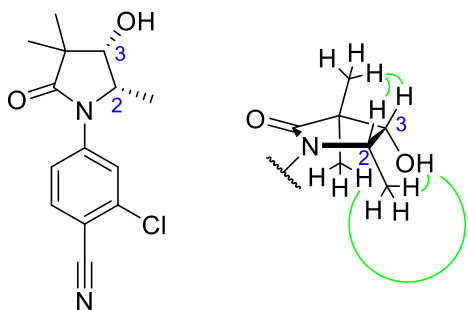
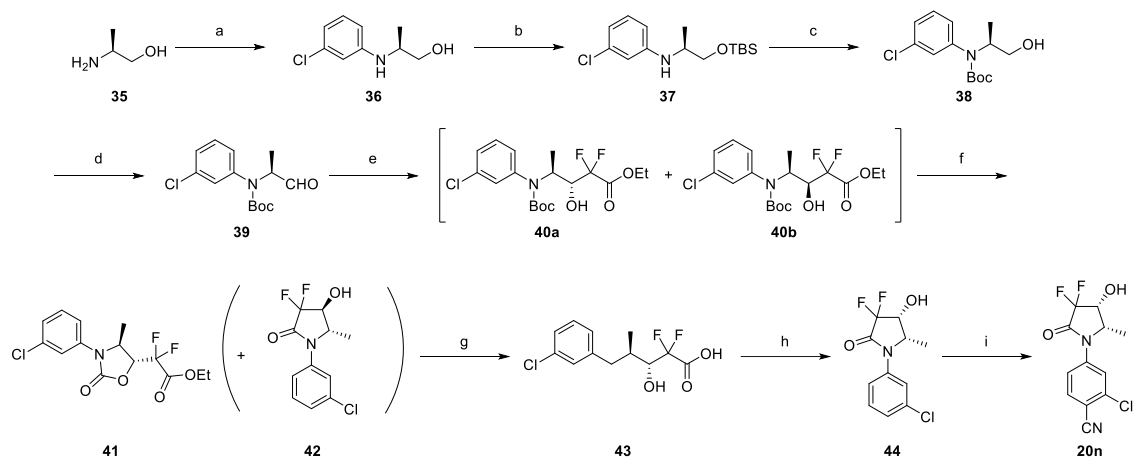


Figure 10. NOE analysis of compound **20m** to determine the relative structure.³⁹

4,4-ジフルオロピロリジン-5-オン誘導体 **20n** は Reformatsky 反応を鍵反応として合成した (Scheme 14)。3-クロロ-1-ヨードベンゼンと(*S*)-2-アミノプロパン-1-オールを、ヨウ化銅を触媒とした Ullmann-Goldberg 反応により縮合して **36** とした後、水酸基を TBSCl とイミダゾールを用いて TBS 保護し **37** とした。更に窒素原子を Boc で保護したのち、TBAF を用いて TBS 基を選択的に脱保護し、化合物 **38** を 64%の収率で得た。更

に1級アルコールを Swern 酸化によりアルデヒドへと変換し、96%の収率で **39** を得た。次いで、化合物 **39** に対して 2-ブロモ-2,2-ジフルオロ酢酸エチルと亜鉛を用いた Reformatsky 反応に付することで、化合物 **40a** と **40b** のジアステレオ混合物として得た。Boc 基の脱保護と、それに引き続く分子内ラクタム化により、カルバメート体 **41** とラクタム **42** をそれぞれ 38%、21%の収率で得た。目的となるアイソマーである化合物 **41** を、水酸化ナトリウム水溶液を用いて加水分解してカルボン酸体 **43** とした後、加熱条件下環化することにより、ラクタム体 **44** を 97%の収率で得た。**44** を酸性条件下、NIS を用いてヨード化し、更にシアン化銅を用いてシアノ化することで、4,4-ジフルオロピロリジン-5-オン誘導体 **20n** を得た。**20n** の相対立体配置は X 線結晶構造解析により決定し⁴¹、光学純度は chiral HPLC 解析により決定した (99.8% *ee*)^{42,43}。

Scheme 14. Synthesis of 4,4-difluoro-pyrrolidin-5-one analog **20n**^a



^aReagents and conditions: (a) 1-Chloro-3-iodobenzene, CuI, (CH₂OH)₂, K₃PO₄, *i*-PrOH, 80 °C, 97%; (b) TBSCl, imidazole, DMF, 50 °C, 97%; (c) (1) *n*-BuLi, THF, −78 °C; (2) Boc₂O, −78 °C to room temperature; (3) TBAF, THF, 64% for 3steps; (d) (COCl)₂, DMSO, Et₃N, THF, −60 °C to −20 °C, 96%; (e) Br(F)₂CCO₂Et, Zn, THF, reflux; (f) (1) 4 M HCl in EtOAc; (2) *i*-Pr₂NEt, THF, reflux, 38% for 3 steps (21% for **27**); (g) 8 M NaOH aq., MeOH, reflux; (h) MeOH, reflux,

97% for 2 steps; (i) (1) NIS, concentrated H₂SO₄, AcOH; (2) CuCN, NMP, 150 °C; (3) recrystallization from EtOAc/n-hexane, 41% for 3 steps (99.8% *ee*).

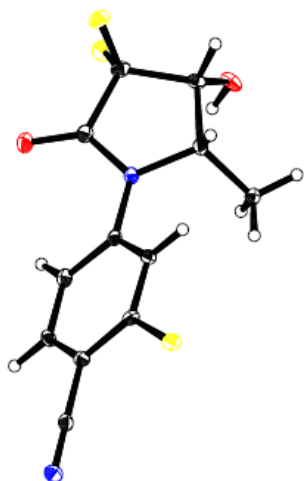
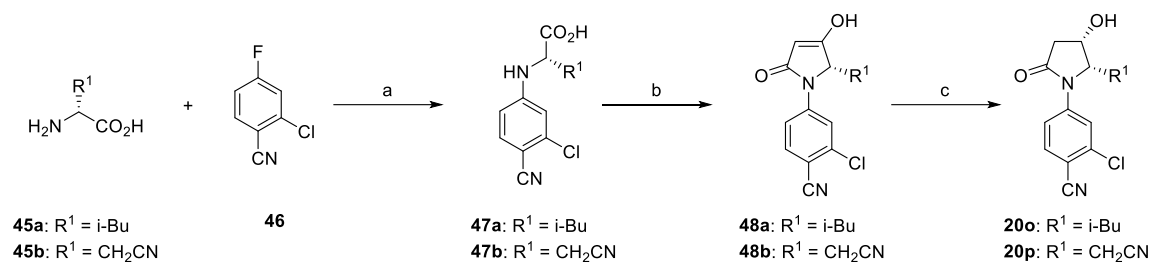


Figure 11. X-ray analysis of compound **20n**.⁴¹

ピロリジン-5-オン誘導体の2位置換基(R¹)の更なる変換は、Scheme 15に従って行った。アミノ酸**45a,b**と2-クロロ-4-フルオロベンゾニトリル**46**とを縮合し、**47a,b**をそれぞれ72%、100%の収率で得た。**47a,b**とメルドラム酸を縮合した後、酢酸エチル中、加熱条件下で環化させることにより**48a,b**を32%、44%の収率でそれぞれ得た。4-(5-オキソピロリジン-1-イル)ベンゾニトリル誘導体**20o,p**は、水素化ホウ素ナトリウムと酢酸を用いた、シス選択的な還元により、59%、62%の収率でそれぞれ得た。**20o**の相対的立体配置はX線結晶構造解析により決定し、**20p**の立体配置は**20o**の立体配置と同じとして決定した (Figure 12)⁴⁴。

Scheme 15. Synthesis of various 3-alkyl (R^1) pyrrolidine-5-one analog **20o,p**^a



^aReagents and conditions: (a) Cs_2CO_3 , DMF, 72–100%; (b) (1) Meldrum's acid, CDI, DMAP, THF, (2) EtOAc, reflux, 32–44% for 2 steps; (c) NaBH_4 , AcOH, CH_3CN , 59–62%.

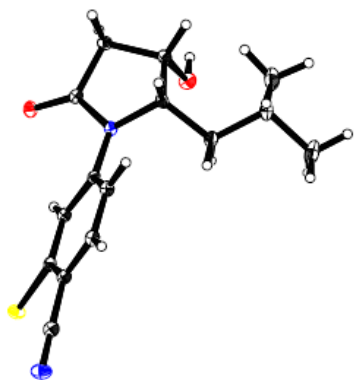
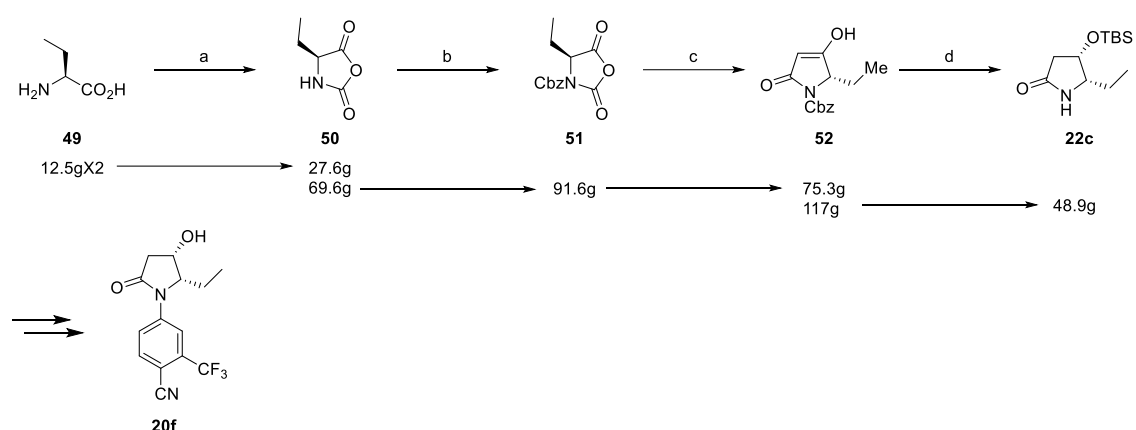


Figure 12. X-ray analysis of compound **20o** to determine the relative structure.⁴⁴

*In vivo*試験に用いる (2*S*,3*S*)-5-オキソピロリジン誘導体**20f**の、立体選択的合成法を検討した (Scheme 16)。これはScheme 10における化合物**22c**と**22d**の分離がシリカゲルクロマトグラフィーでは悪く、大量合成には向かないためである。(S)-2-ブタン酸**49**をトリホスゲンにより活性化し、更に環化させることで化合物**50**を89%の収率で得た。更にCbz保護を掛けることで化合物**51**を65%の収率で得た。高反応性化合物**51**とメルドラム酸を縮合した後、加熱条件下、環化反応をすることにより化合物**52**を83%の収率で得た。次いで水素化ホウ素ナトリウムと酢酸を用いて、シス選択的還元反応を行った。更

に水酸基をTBS基で保護したのち、Cbz基を脱保護することにより化合物**22c**を19%の収率で得た。最終化合物である**20f**の大量合成は、Scheme 4と同じ反応条件で合成した。本法により合成した化合物**20f**の光学純度はchiral HPLCによって確認した^{45,46}。しかし本合成法は反応性が非常に高いtriphosgeneを用いるという問題点があった。更にカラムに精製4回を含む7ステップが必要であるため、毒性試験に必要な100 gスケールの合成には適さなかった。

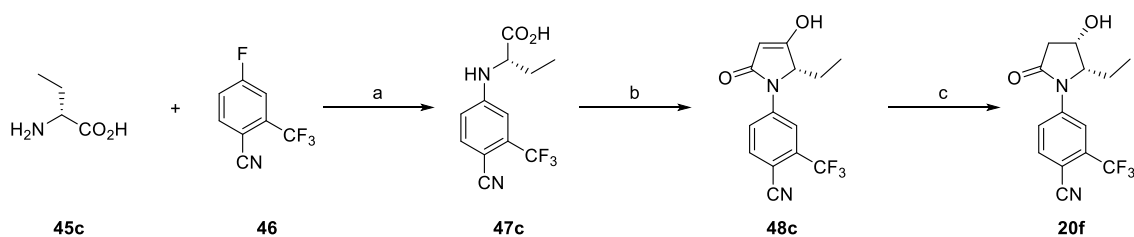
Scheme 16. *Cis*-selective synthesis of ethyl analog **20f**^a



^aReagents and conditions: (a) triphosgene, THF, 50 °C, 89%; (b) benzyl chloroformate, *N*-methylmorpholine, 0 °C, 65%; (c) (1) Meldrum's acid, Et₃N, THF, (2) EtOAc, reflux, 83% for 2 steps; (d) (1) NaBH₄, AcOH, quant.; (2) TBSCl, imidazole, DMF, (3) Pd/C, H₂, MeOH, 45% for 3 steps.

そこで更に検討した結果、化合物 **20o,p** を合成する際に用いたルートが、カラム精製が 1 回、且つ 3 ステップで終了することを見出した。その後反応条件の最適化を行い、最終的にカラム精製を行わないルート (Scheme 17) が確立され、本合成法を用いて毒性試験サンプルの合成を行った。本合成法については追って報告される予定である。

Scheme 17. *Cis*-selective synthesis of ethyl analog **20f**^a



^aReagents and conditions: (a) Cs₂CO₃, DMF; (b) (1) Meldrum's acid, CDI, DMAP, THF, (2) EtOAc, reflux; (c) NaBH₄, AcOH, CH₃CN.

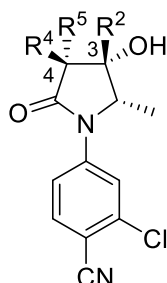
3.3 生物評価の結果と考察

3.3.1 AR 親和性、及びレポータージーンアッセイ

AR 親和性は放射性標識された [³H]mibolerone と化合物の置換で評価し、IC₅₀ でその活性を示した。また機能活性はルシフェラーゼ活性で決定し、EC₅₀ として示した。

最初に、5-オキソピロリジン環 4 位置換基の効果を評価した (Table 4)。驚くべきことにトランス位 (R⁴) にメチル基を導入した **2i** では、AR 親和性が 10 倍 (IC₅₀ = 1.3 nM)、アゴニスト活性は 800 倍向上した (EC₅₀ = 1.0 nM)。エチル基 (**2j**) でも同様にアゴニスト活性が向上したが、ベンジル基 (**2k**) ではその効果が得られなかった。4,4-ジメチル体 (**2m**, EC₅₀ = 30 nM)、4,4-ジフルオロ体 (**2n**, EC₅₀ = 12 nM) では中程度の活性向上が確認された。これらの結果は 5-オキソピロリジン環 4 位付近、特にトランス方向に脂溶性の小さなポケットがあることを示している。**19b** のシリーズでは、ピロリジン環 3 位への置換基導入が活性向上に寄与したが、5-オキソピロリジン誘導体においては 3 位 (R²) へのメチル基導入は、アゴニスト活性を向上させなかった (**2c**, EC₅₀ = 150 nM)³⁵。

Table 4. Binding inhibitory and agonistic activities of 4-(5-oxopyrrolidine-1-yl)benzonitrile derivatives.



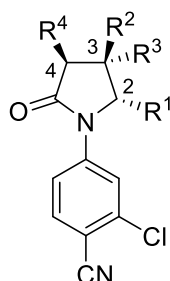
Compd.	R ⁴	R ⁵	R ²	AR binding ^a	AR reporter ^a
				IC ₅₀ (nM) ^b	EC ₅₀ (nM) ^b
20a	H	H	H	7.8 (5.7-11)	810 (500-1300)
20i	Me	H	H	1.3 (1.2-1.4)	1.0 (0.70-1.5)
20j	Et	H	H	3.2 (2.6-4.1)	3.6 (2.2-5.9)
20k	Bn	H	H	6.0 (5.1-7.0)	220 (160-290)
20m	Me	Me	H	14 (11-17)	30 (19-47)
20n	F	F	H	1.1 (0.90-1.3)	12 (7.0-19)
20c	H	H	Me	15 (12-18)	150 (59-370)

^aHuman AR was used. ^bIC₅₀ and EC₅₀ values are presented as means of duplicate experiments, with 95% confidence intervals (95%CI) in parentheses.

次に 5-オキソピロリジン環 2 位置換基 (R¹) の変換を行った (Table 5)。驚くべきことに、メチル基 (**20a**) をエチル基に変換するだけで、アゴニスト活性が 130 倍向上した (**20d**, EC₅₀ = 6.0 nM)。一方、イソブチル体ではアゴニスト活性は向上しなかった (**20o**, EC₅₀ = 170 nM)。また極性の高いシアノメチル体 **20p** ではアゴニスト活性が大きく減弱した。これらの結果はピロリジン環 2 位付近のポケットは、小さく且つ脂溶性

であることを示唆している。この結果を基に **20d** の変換をさらに行った。予想通りに、4 位へのトランスメチル基導入は、アゴニスト活性を大きく向上させた ($EC_{50}=0.39$ nM)。5-オキソピロリジン環 3 位(*R*)-OH 体でも活性が向上し (**20e**, $EC_{50}=8.0$ nM)、ナフトニトリル誘導体と同じ傾向を示した⁴⁷。

Table 5. Binding inhibitory and agonistic activities of 4-(5-oxopyrrolidine-1-yl)benzonitrile derivatives.



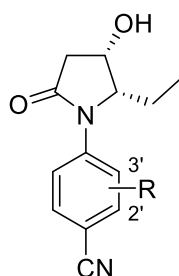
Compd.	R ¹	R ⁴	R ²	R ³	AR binding ^a	AR reporter ^a
					IC ₅₀ (nM) ^b	EC ₅₀ (nM) ^b
20a	Me	H	H	OH	7.8 (5.7-11)	810 (500-1300)
20d	Et	H	H	OH	3.9 (2.7-5.6)	6.0 (4.3-8.4)
20o	i-Bu	H	H	OH	5.5 (4.7-6.5)	170 (69-410)
20p	CH ₂ CN	H	H	OH	14 (10-20)	>10000
20l	Et	Me	H	OH	1.8 (1.6-2.1)	0.39 (0.29-0.52)
20e	Et	H	OH	H	3.4 (2.6-4.5)	8.0 (5.3-12)

^aHuman AR was used. ^bIC₅₀ and EC₅₀ values are presented as means of duplicate experiments, with 95% confidence intervals (95%CI) in parentheses.

次にベンゾニトリル上置換基 (R) の変換を行った。2'-トリフロオロメチル誘導体

20f は強いアゴニスト活性 ($EC_{50} = 4.7$ nM) を示した。一方、2'-メトキシ (**20g**, $EC_{50} = 24$ nM)、2'-クロロ-3'-メチル (**20h**, $EC_{50} = 23$ nM) では活性が減弱した。

Table 6. Binding inhibitory and agonistic activities of 4-(5-oxopyrrolidine-1-yl)benzonitrile derivatives.



Compd.	R	AR binding ^a	AR reporter ^a
		IC ₅₀ (nM) ^b	EC ₅₀ (nM) ^b
20d	2'-Cl	3.9 (2.7-5.6)	6.0 (4.3-8.4)
20f	2'-CF ₃	3.6 (2.5-5.0)	4.7 (3.3-6.8)
20g	2'-OMe	9.2 (6.8-13)	24 (18-31)
20h	2'-Cl-3'-Me	9.0 (6.9-12)	23 (16-34)

^aHuman AR was used. ^bIC₅₀ and EC₅₀ values are presented as means of duplicate experiments, with 95% confidence intervals (95%CI) in parentheses.

3.3.2 *In vivo* モデルにおける臓器選択性

In vivo モデルにおける臓器選択性は、Hershberger アッセイ³⁴を用いて評価した。本試験においては肛門挙筋重量をタンパク同化作用の指標として、前立腺及び精嚢腺重量を男性ホルモン活性の指標とした。化合物 (2.5 mg/kg, bid, po) を去勢した SD ラット (4 週齢) に 4 日間投与した。本試験においては、化合物と同時にテストステロンプロピオネート (TP, 0.5 mg/kg/day, sc, qd.) を投与した。これはラットでは産生されない副

腎性テストステロンを補充することで、本試験をヒトに外挿することが目的である。本タイプの試験において皮下投与された **TP** は、前立腺と肛門挙筋に対して同等の効果を示すことが報告されている。

弱いアゴニスト活性 ($EC_{50}=24\text{ nM}$) を有する化合物 **20g** は、本試験では肛門挙筋、前立腺ともに影響を与えなかった。一方、同じ弱いアゴニストである **20c** ($EC_{50}=150\text{ nM}$) は前立腺重量を減少させた。化合物 **20c** は極めて良好な薬物動態を示し⁴⁸、それが本アッセイにおける薬効の原因であると考ええる。この結果は弱いアゴニストが、十分量前立腺に移行した場合には、アンタゴニスト活性を示すことができる、ということを示唆している。強いアゴニスト活性を有する **20n** ($EC_{50}=12\text{ nM}$)、**20d** ($EC_{50}=6.0\text{ nM}$)、**20e** ($EC_{50}=8.0\text{ nM}$)、**20f** ($EC_{50}=4.7\text{ nM}$) は臓器選択的アゴニスト活性を示した。これら化合物はビークル群と比較して、肛門挙筋重量を 130% まで増加させた。一方、4 化合物共に前立腺重量には影響を与えなかった。対照的に非常に強いアゴニスト活性を有する **20i** ($EC_{50}=0.39\text{ nM}$) は、肛門挙筋、前立腺重量をともに増加させ、本化合物が両臓器に対して単なるアゴニストとして作用していることを示唆している。これら *in vivo* 試験の結果から、化合物 **20n,d,e,f** は肛門挙筋と前立腺に対して、臓器選択的作用を有する **SARM** であることを確認した。

Table 7. Tissue selectivity in vivo (3-week old immature rats, 2,5 mg/kg, bid, po, 4-days treatment).

Compd.	AR binding ^a	AR reporter ^a	Tissue Selectivity (%) ^c	
	IC ₅₀ (nM) ^b	EC ₅₀ (nM) ^b	Levator ani	Prostate
20g	9.2 (6.8-13)	24 (18-31)	114	90
20c	15 (12-18)	150 (59-370)	116	76*
20n	1.1 (0.90-1.3)	12 (7.0-19)	139*	85
20d	3.9 (2.7-5.6)	6.0 (4.3-8.4)	134*	94
20e	3.4 (2.6-4.5)	8.0 (5.3-12)	124*	84
20f	3.6 (2.5-5.0)	4.7 (3.3-6.8)	129*	106
20l	1.8 (1.6-2.1)	0.39 (0.29-0.52)	161*	149*

^aHuman AR was used. ^bIC₅₀ and EC₅₀ values are presented as means of duplicate experiments, with 95% confidence intervals (95%CI) in parentheses. ^cThe values shown are the values compared with the control group (TP, 0.5 mg/kg/day, sc, qd). * $p \leq 0.05$ (Student's t-test) when compared with the TP (0.5 mg/kg)-treated control group (n=5).

次に化合物 **20f** を選択し、*in vivo* における用量依存性を確認した。化合物 **20f** (0.15, 0.50, 1.5, 5.0, 15 mg/kg/day, qd, po) を、8 週齢の去勢ラットに TP (0.4 mg/kg/day, qd, sc) とともに 7 日間投与を行った。化合物 **20f** は最小用量 (0.15 mg/kg/day) から有意に肛門挙筋重量を増加させ、且つ用量とともにその効果は大きくなった。一方、前立腺に対しては最高用量 (15mg/kg/day) においても有意な影響を及ぼさなかった。本結果をもって、化合物 **20f** を開発候補品として選択し、更なるプロファイリングを行った。

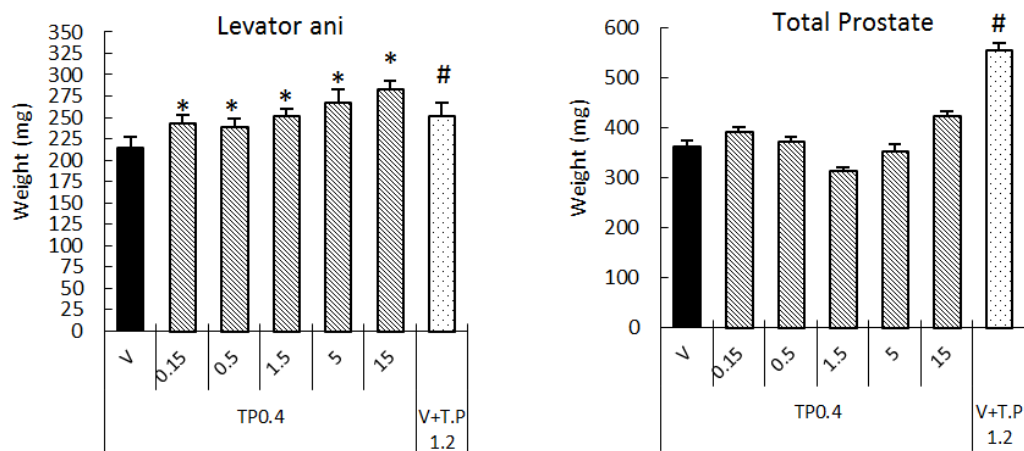


Figure 13. Dose dependency for tissue selectivity in vivo (8-weeks-old SD rats, 7 days treatment).

* $p \leq 0.05$ (Dunnett test) when compared with the TP (0.4 mg/kg)-treated control group ($n = 5$).

$p \leq 0.05$ (T-test) when compared with the TP (0.4 mg/kg)-treated control group

3.3.3 性行動惹起試験

CNS におけるアゴニスト作用を確認するため、性行動惹起試験を行った (Table 8)。

繁殖能を有するラットを選択し、性行動を除去するために去勢を行った。化合物を 3 週間投与したのち、雌ラットの偽妊娠率で性行動が惹起されているかで評価した。化合物 **20f** は最小用量 (0.5 mg/kg/day, qd, po) から性行動を惹起した。本結果によって、化合物 **20f** が中枢においてもアゴニスト作用があることが示された。

Table 8. Sexual behavior induction assay

Compound	Dose (mg/kg, qd, for 21 days)				
	0	0.5 ^a	1.5 ^a	5.0 ^a	3.0 ^b
20f	0	100%*	100%*	86%*	/
TP (3 mg/kg, sc)	/	/	/	/	100%*

^apo ^bsc *induction rate of pseudopregnancy (% of total number), $p \leq 0.05$ (Fisher's exact test-test) when compared with the vehicle-treated control group ($n = 7$).

3.3.4 薬物動態

ラット、イヌ、サルにおける薬物動態を評価した (Table 9)。化合物 **20f** はすべての種において、良好な経口吸収性 (B.A.) を示した (ラット 74.6%、イヌ 76.6%、サル 48.1%)。更に、**20f** はラット、イヌ、サル、ヒトにおいてほとんど種差なく、良好な代謝安定性を示すことが分かった (Table 10)。これらのデータは、化合物 **20f** の薬物動態が *in vitro* での代謝安定性と関連性があり、**20f** がヒトでも良好な薬物動態が期待出来ることを示している。

Table 9. Pharmacokinetic parameters of **20f**^a

Animal	iv (0.1 mg/kg)				
	C _{5min} (ng/mL)	AUC _{0-24h} (ng•h/mL)	MRT (h)	Vd _(ss) (mL/kg)	CL _{total} (mL/h/kg)
rat ^b	70.8	108.5	2.32	2167	934
dog ^c	106.2	150.5	4.84	3297	681
monkey ^d	72.9	118.3	1.72	1469	853

Animal	po (1 mg/kg)				
	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-24h} (ng•h/mL)	MRT (h)	B.A. (%)
rat ^b	218.1	0.50	809.4	3.06	74.6
dog ^c	264.9	0.75	1159.5	4.34	76.6
monkey ^d	71.2	1.67	557.8	5.21	48.1

^aData are expressed as the mean ± S.D. (*n* = 3). ^bCrI:CD(SD) rat (male). ^cBeagle dog (male).

^dCynomolgus monkey (male).

Table 10. Metabolic stabilities of compound **20f**.

Animal	Metabolic stability (μL/min/mg)
rat	21
dog	4
mouse	3
monkey	5
human	1

3.3.5 核内受容体選択性

MR (Mineralocorticoid Receptor)、GR (Glucocorticoid Receptor)、ER (Estrogen Receptor)、PR (Progesterone Receptor) に対する核内受容体選択性を評価した (Table 11)。これらのデータは化合物 **20f** が AR に対して高い選択性を持つことを示している。

Table 11. Nuclear receptor selectivity of **20f**

Compound	Binding ^a (IC ₅₀ ^b , nM)				Reporter ^a (EC ₅₀ ^b , nM)	
	AR	MR	GR	ER	AR	PR
20f	6.3	>10000	>10000	>10000	7.6	>10000
Dihydrotestosterone	0.67	360	540	7300	3.0	8200

^aHuman AR was used ($n = 2$). ^bIC₅₀ and EC₅₀ values shown are the mean values of duplicate measurements ($n = 2$).

3.3.6 毒性評価

次に、**20f** のラット、イヌ、サルにおける 2 週毒性試験（経口）を行った。サルを用いた試験において、薬効用量の 200 倍以上の血中濃度でけいれん、心筋の壊死が起こったが、それ以外の事象は全て薬効由来であった。心電図、脈拍、血圧への影響を麻酔下のイヌ（単回静脈投与）を用いて行ったが、影響は見られなかった。心臓への影響については、ヒトでの臨床試験で確認していく必要がある^{49,50}。

3.3.7 AR リガンド結合領域と化合物 **20f** との共結晶構造解析

化合物 **20f** とアンドロゲン受容体との結合様式を確認するため、共結晶構造解析を行った。化合物 **20f** と AR リガンド結合領域（アミノ酸残基 671-919）との結晶が 1.4 Å の分解能で得られた（Figure 14）。Trp741, Met742, Met745 は 2 位付近の、Leu701, Met780, Leu873 は 4 位付近の小さな脂溶性ポケットを構築しており、この結果は、5-オキソピロリジン環の 2 位及び 4 位付近に小さな脂溶性ポケットがある、と言う我々の仮説に合致している。特に 4 位周辺のポケットはトランス方向に存在し、トランス-4-メチル体である **20i,l** の高い活性を支持している。**20f** の結合様式は、既に報告されている化合物 **20a,b** とほとんど同じであることが分かった。また、化合物 **20f** は分子の両端において水素結合により安定化されている。シアノ基は、Arg752 の側鎖及び Met745 のカルボニル基と

水を介した水素結合をしている。5-オキソ-ピロリジン環 3 位の水酸基は Asn705 の側鎖カルボニル基と水素結合を形成している。化合物 **20f** は **20a,b** と異なり、Thr877 と水素結合を形成していないが、他のロータマーでは結合していると考えられる。

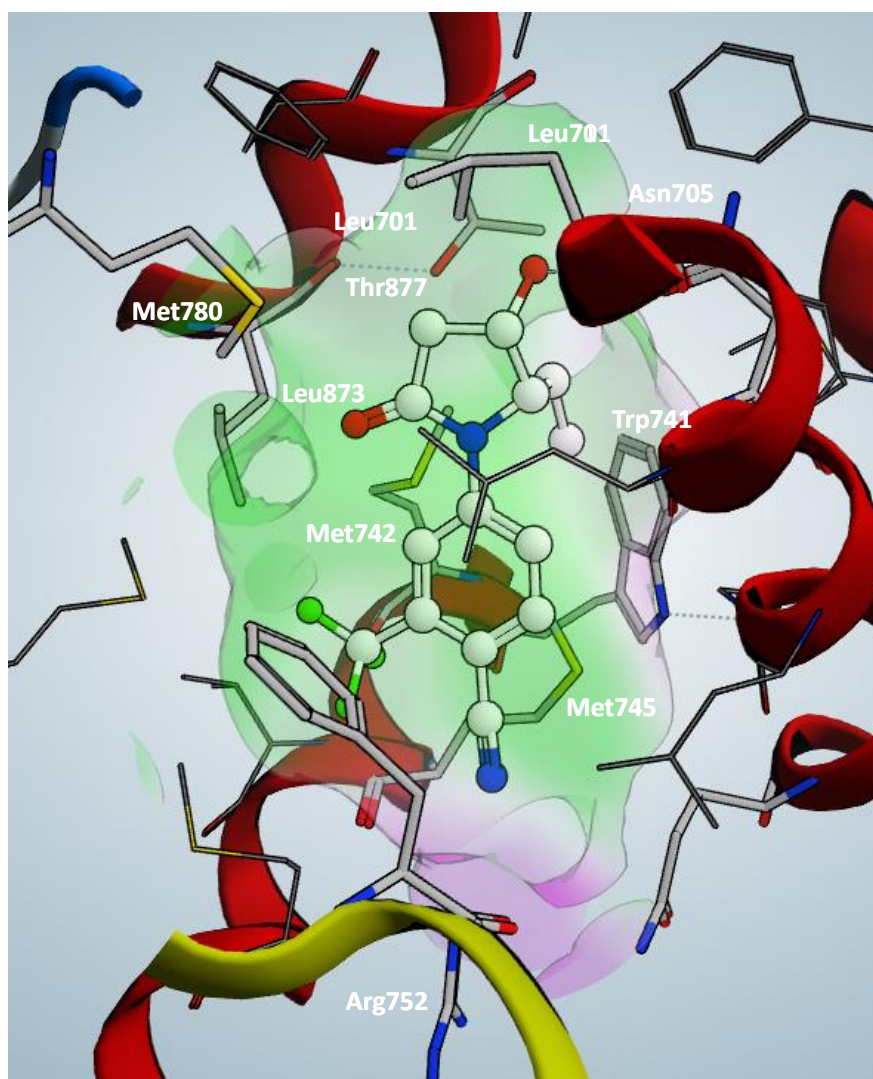


Figure 14. Co-crystal structure of **2f** with AR.

3.3.8 臓器選択性に関する考察

第二章、第三章に示したように、SARM 化合物は筋肉重量を増加させる一方、前立腺重量には変化を与えない。臓器選択性が惹起される原因として、2つの理由が考えら

れる。1 つは化合物の臓器移行性であり、もう 1 つは化合物そのもののプロファイルである。臓器移行性については、第二章第三節において、**17j** の化合物濃度は脳>血漿＝前立腺>肛門挙筋であり、臓器移行性が臓器選択性の原因ではないことを示した (Figure 5)。このことから臓器選択性が惹起される原因は、**SARM** 化合物のプロファイル、すなわち **AR** に対するパーシャルアゴニスト（部分作動薬）であるためだと考えられる。

パーシャルアゴニストは受容体に結合した際、フルアゴニストと比較して 100% の転写活性は発現しない (Figure 15)。これはパーシャルアゴニストの結合による受容体の構造変化がフルアゴニストとは異なり、転写活性を発現するためのコファクターを 100% リクルートできない、もしくはコファクターをリクルートした後に、転写活性を発現しないためだと考えられている。

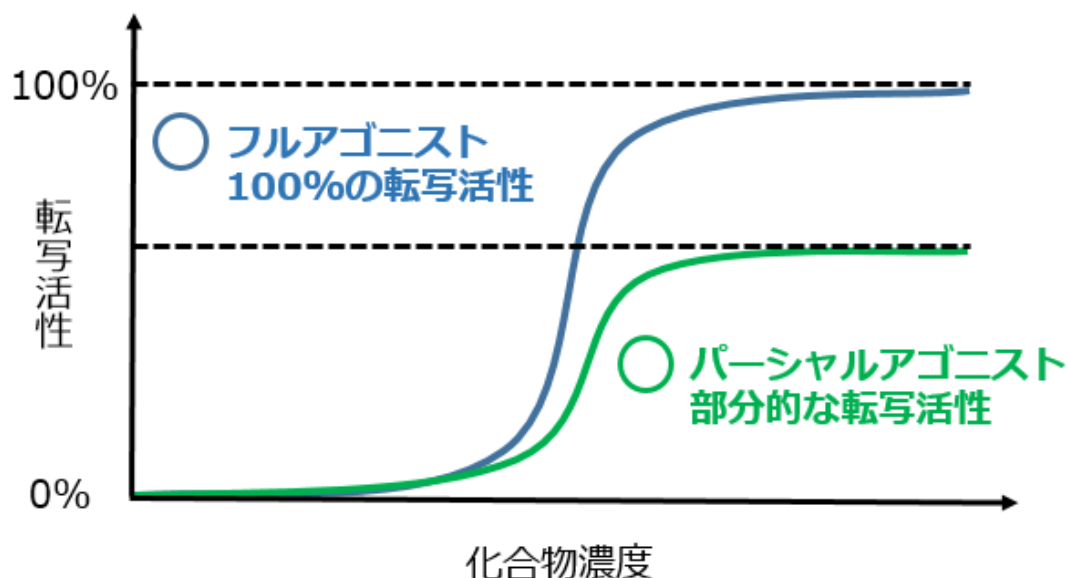


Figure15. フルアゴニストとパーシャルアゴニストの比較

AR に関しては、幾つかのコファクターに対するリクルート能力が、パーシャルアゴニストと **DHT** 間で異なることが報告されている^{51,52}。特にコファクターの一つであ

る PIAS1 に対しては、パーシャルアゴニストである TSAA291、TSAA272 のリクルート能力が、フルアゴニストである DHT、テストステロンに比べて低い。更に PIAS1 は前立腺細胞において、筋肉細胞よりも発現量が高いこともわかっている。これらのことは、前立腺における TSAA291、TSAA272 の転写活性が、PIAS1 をリクルートできないために DHT と比べて低い、すなわち *in vivo* における前立腺重量増加に対する影響が小さいことを示唆している。化合物 **20f** においても同様な現象が起こり、臓器選択性を惹起する原因になっていると考えられる。

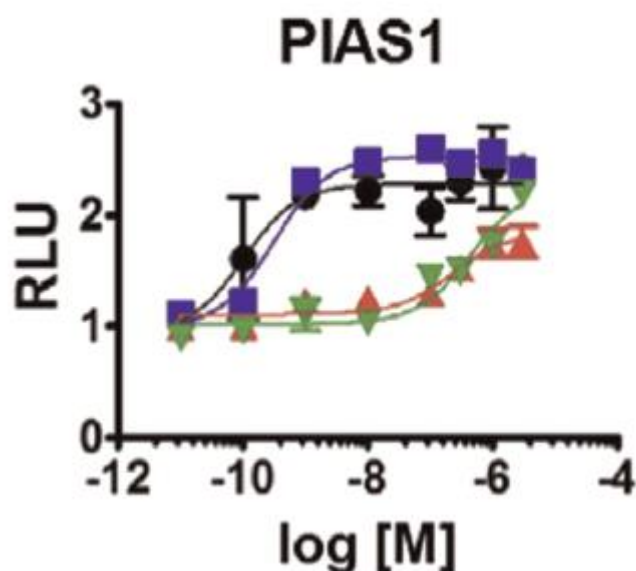


Figure 16. SARM 化合物 (TSAA291 ▲、TSAA272 ▼)、及び内因性アンドロゲン (フルアゴニスト、DHT ●、テストステロン ■)を用いたコファクターリクルート解析⁵¹

一方、コファクターをリクルートした後に、SARM とフルアゴニストで転写活性能力が異なるか、についてはこれまで報告が無いため、臓器選択性の原因となっているかは不明である。

SARM の肛門挙筋と前立腺における転写活性について考察する。肛門挙筋において

は上記 PIAS1 の発現が弱いことなどから、低濃度から活性が発現し、転写活性の大きさもフルアゴニストに近いと考えられる。一方前立腺においては、低濃度においては転写活性が発現せず、且つ最大転写活性もフルアゴニストに比べて小さい (Figure 17)。

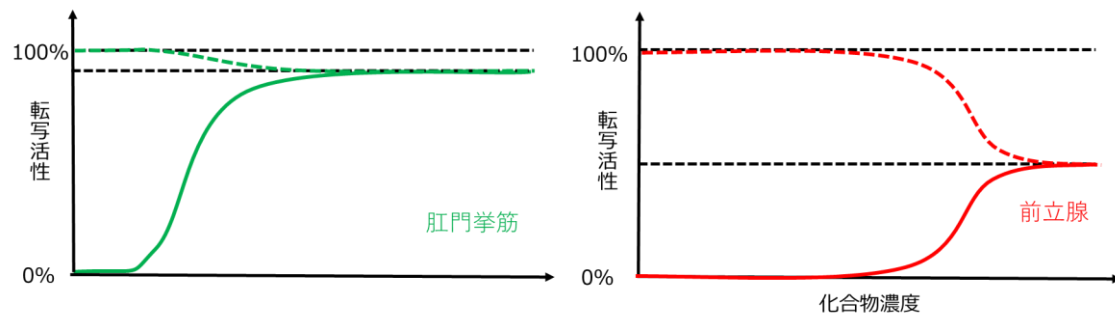


Figure 17. 肛門挙筋と前立腺における SARM 化合物の転写活性

次に化合物 **20n,d,e,f** の臓器選択性発現について説明する。化合物濃度を青で示した。これら化合物は Figure 17 で示した通り、肛門挙筋においては転写活性が高いため、肛門挙筋重量をフルアゴニストであるテストステロン同様に増加させる。一方前立腺においては化合物濃度が不十分であるため、前立腺重量に影響を与えない (Figure 18)。

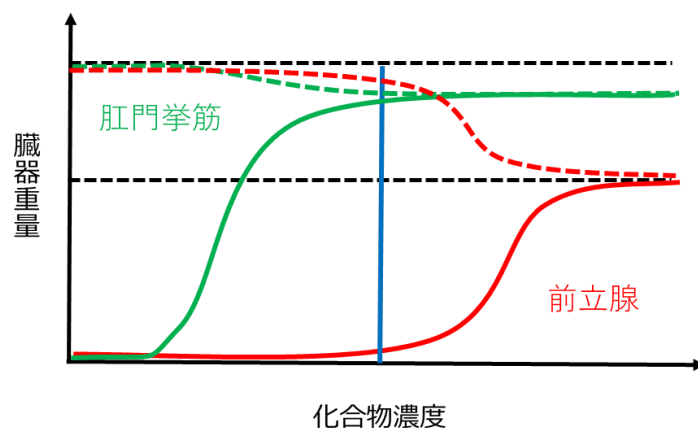


Figure 18. 化合物 **20n,d,e,f** の臓器選択性

化合物 **20c** が前立腺重量を減少させる作用を示した原因について考察する。既に第

三章第三節に示した通り、**20c** のアゴニスト活性は低い（ $EC_{50} = 150 \text{ nM}$ ）、血中濃度が類似化合物と比べて 10 倍高い（ $AUC_{0-24h}(\text{ng}\cdot\text{h/mL}) = 7336$ ）。**20c** は活性が低いため、肛門挙筋においては転写活性を発現するに至らないが、前立腺においては同時投与された DHT（TP の代謝物）に対してアンタゴニストとして働き、結果として前立腺重量が減少していると考えられる（Figure 19）。

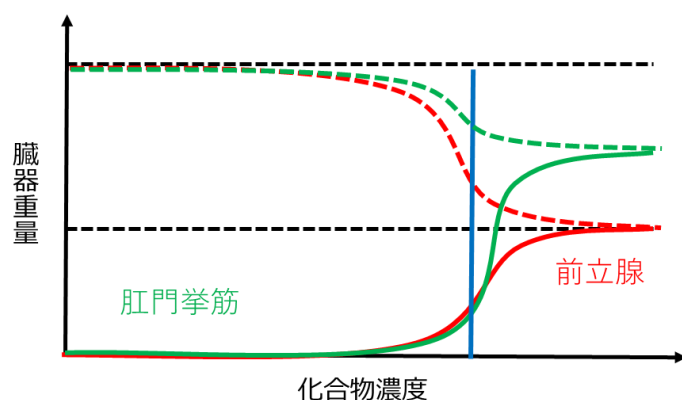


Figure 19. 化合物 **20c** の臓器選択性

一般的にフルアゴニストとパーシャルアゴニストでは、受容体に結合した際に引き起こす構造変化が異なり、それがコファクターのリクルート能力に影響していると考えられている。コファクターリクルートに対する構造変化を検証するため、フルアゴニストである **19a**、及びパーシャルアゴニストである **19b**、**20f** と、AR LBD との X 線結晶解析データとの比較を行った。しかしながら予想に反して、これら 3 化合物と AR LBD との結合様式はほぼ同じであり、明確な違いは見られなかった（Figure 20）³⁵。

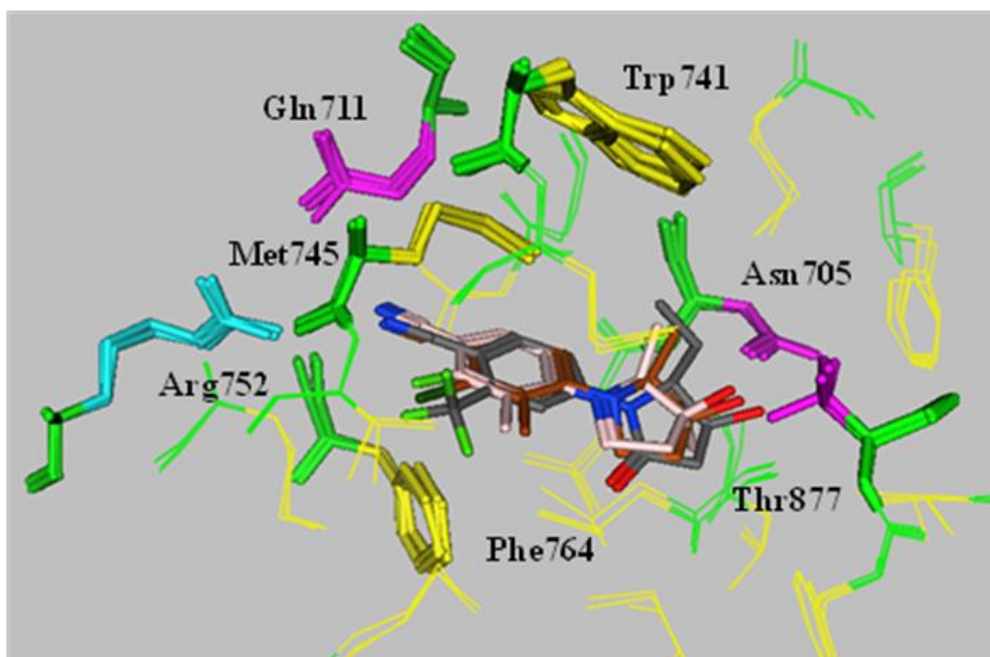


Figure 20. Superimposed structures of **20f** (grey), **19b** (pink), **19a** (orange) with AR.

更に、上記共結晶の温度因子について検討を行った (Figure 21)。Figure 21 において、青色の部分は温度因子が小さく構造が固い部分、赤の部分は温度因子が大きく構造が柔らかい部分である。3つの共結晶は分解能が異なるため、共結晶間における温度因子の絶対値を用いた比較は難しい。よって、それぞれの結晶における相対的な温度因子、すなわち構造の揺らぎを調べた。その結果、フルアゴニストである **19a**、及びパーシャルアゴニストである **19b**、**20f** の間で、Helix 12 の挙動を含め、温度因子に関しても、明確な差は見られなかった。

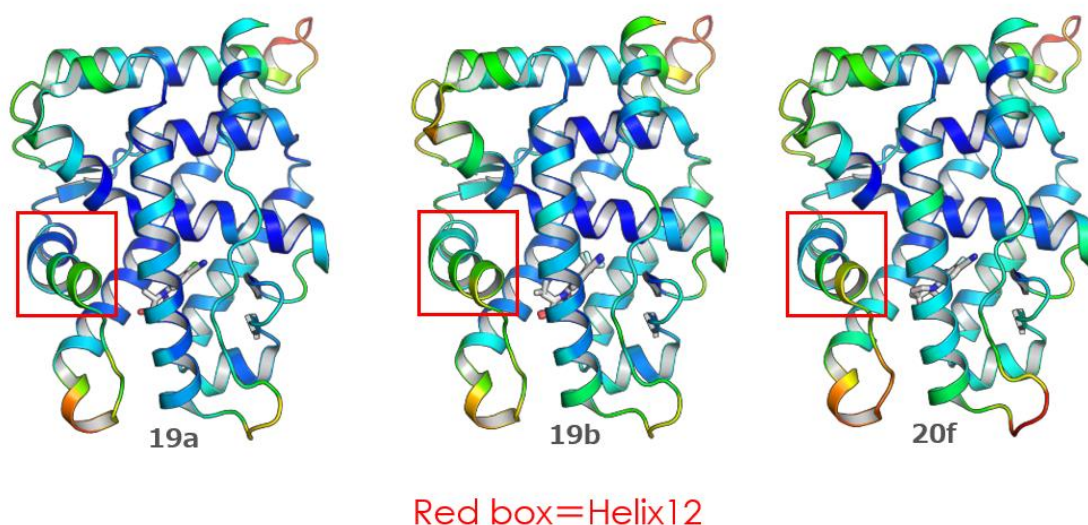


Figure 21. フルアゴニスト **19a**、及びパーシャルアゴニスト **19b**、**20f** と、アンドロゲン受容体との共結晶を用いた温度因子解析

これらの結果は、固定された AR LBD との共結晶では観察されない、実際のタンパクにおける小さな構造変化の違いが、AR 全体の構造変化を引き起こし、その結果としてコファクターリクルートに影響を及ぼしていることを示唆している。

SARM の臓器選択性メカニズムを理解するためには、更に研究を進める必要がある。

①各臓器において、存在するコファクターの種類と量、②転写される RNA の種類、および量、③転写された RNA により発現するタンパクの種類、量。上記 3 項目を詳細に調べることで、化合物の AR に対する結合から、臓器選択性発現までのプロセスを理解できると考えられる。それらの知見を基に研究を行うことで、より臓器選択性の高い化合物の合成が可能になると期待される。

第四章 総括

臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター (SARMs) の合成と生物活性に関する研究を行った結果、下記の成果を得た。

1. HTS から得られた 1-(4-ニトロ-1-ナフチル)ピロリジン (**A**) をリードとし、ARLBD とのドッキングモデルスタディによる仮説を基に、最適化検討を行った。その結果、仮説通り、ナフタレン環 4 位ニトロ基のシアノ基への変換、ピロリジン環 2 位への脂溶性置換基の導入、同じく 3 位への水酸基の導入が、活性向上に有効であることを証明した。その中で、化合物 **17h,17m,17j** が、ラットを用いた *in vivo* 試験において、肛門挙筋重量を増加させる一方、前立腺重量を増加させない SARM プロファイルを有することを見出した。更に本化合物はラットを用いた性行動惹起試験においてアゴニスト活性を示し、中枢においても薬効を示すことを見出した。
2. ピロリジン環の酸化代謝部位をオキシ基でブロックした **20a** をデザインし、鍵反応として Buchwald 反応を用いて合成した。**20a** は期待通り代謝安定性に優れていたため、本化合物を出発物質とし、アゴニスト活性の向上を指向して最適化検討を行った。ARLBD とピロリジン誘導体 **19a** との共結晶構造解析結果、及び本系統化合物の構造活性相関から、5-オキシピロリジン環 2 位、3 位、4 位への置換基導入、及びベンゾニトリル上置換基の変換を行った。その結果、良好な代謝安定性は維持されたまま、アゴニスト活性を向上させることに成功した。また、ラットを用いた *in vivo* 試験において、3 種類の異なるプロファイルを有する化合物を見出した。(1)前立腺に対するアンタゴニスト作用 (**20c**)、(2)筋肉に対してはアゴニスト作用を示し、前立腺に対しては無作用 (**20n,d,e,f**)、(3)筋肉及び前立腺両者に対してアゴニスト作用 (**20l**)。化合物 **20f** は、中枢でのアゴニスト作用、良好な薬物動態、代謝安定性及び核内受容体選択性、十分な安全性マージンを示した。更に **20f** と ARLBD との共

結晶構造解析の結果から、合成戦略の仮説が正しいことを証明した。

3. 臓器選択性の原因を究明するため、**17j** の薬物動態試験を行い、臓器移行性を検討した。その結果、**17j** の化合物濃度は脳>血漿＝前立腺>肛門挙筋であり、薬物濃度が臓器移行性の原因ではないことが確認された。臓器選択性の理由の一つとして、SARM がパーシャルアゴニストであり、PIAS1 等のコファクターをリクルートする能力がフルアゴニストとは異なることが挙げられる。パーシャルアゴニスト及びフルアゴニストと ARLBD との共結晶構造解析を比較した結果、結合様式、温度因子共に、その差はほとんど無かった。これは、固定された共結晶では観察されない、動きのあるタンパクとの結合様式の違いが、コファクターをリクルートする能力に影響があることを示唆している。

SARM は LOH や悪液質に対する有効な薬剤となる可能性を秘めているが、長期投与になることが予想され、安全性が重要視される。本研究で見いだされた **20f** は臓器選択性試験において前立腺に影響を与えないだけでなく、良好な核内受容体選択性、安全性試験における安全性マージンが示されていることから、SARM として理想的なプロファイルを有する。SARM は筋肉増強等の効果から、「寝たきり」を改善し、患者さんの QOL を上げるだけでなく、社会経済的に有効な薬剤となりうる。本研究における構造活性相関や臓器選択性の結果は、今後の SARM 研究に大きく貢献できると考えている。

また、本研究で行われた化合物開発スキームは、典型的な化合物最適化スキームとなる。今後アカデミア発創薬を指向して、AMED やアカデミア研究者と製薬企業がと議論する際の、モデルケースとして使用できると考えられる。

実験項

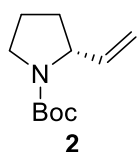
Chemistry

融点はOptiMelt melting point apparatus MPA100 (Standard Research Systems) を用いて決定し、修正は行っていない。核磁気共鳴 (^1H NMR) スペクトルはVarian Gemini-200 (200 MHz)、Varian Mercury-300 (300 MHz)、Bruker DPX300 (300 MHz) もしくはBruker Avance II+ 600 (600 MHz) を用いて測定した。化学シフトは δ (ppm) は、内部標準としてテトラメチルシランを用いて記録した。多重度は次のように表した: s, singlet; d, doublet; t, triplet; q, quartet; qui, quintet; dd, doublet of doublet; ddd, doublet of doublet of doublets; dt, doublet of triplet; br s, broad singlet; m, multiplet。スピン結合定数は (J values) はヘルツ (Hz) で表記した。元素分析は旧武田分析研究所において、vario EL cube もしくはvario micro cube (Elementar) を用いて実施した。分析用薄層クロマトグラフィー (TLC) にはsilica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck)、もしくはNH TLC plates (Fuji Silysia Chemical Ltd.) を用いた。カラムクロマトグラフィーによる分離は、silica gel columns 60 (0.063–0.200 mm or 0.040–0.063 mm, Merck)、basic silica gel (ChromatorexNH, 100–200 mesh, Fuji Silysia Chemical Ltd.)、もしくはPurif-Pack (SI 60 μM or NH 60 μM , Fuji Silysia, Ltd.) を用いて行った。市販の試薬や溶媒は、追加の精製は行わずそのまま使用した。マスマスペクトル (MS) は、Agilent LC/MS system (Agilent 1200SL/Agilent 6130MS)、Shimadzu LC/MS system (LC-10ADvp high-pressure gradient system/LCMS-2010A)、Shimadzu UFLC/MS (Prominence UFLC high-pressure gradient system/LCMS-2020) を用いて、エレクトロスプレーイオン化法 (ESI) で測定した。使用したカラム及び条件を次に示す: L-column 2 ODS (3.0 \times 50-mm I.D., 3 μm , CERI, Japan)、40 $^{\circ}\text{C}$ 、1.2もしくは1.5 mL/min、移動相A ; 0.05% TFA/超純水および移動相B ; 0.05% TFA/アセトニトリル (次の条件に従い含有率を変化させた: 5% to 90% over 2 min and maintained at 90% over the next 1.5 min, after which the column was

equilibrated to 5% for 0.5 min)。化合物**17a-k**, **17h'**, **17m'**, **18**及び**20a-p**の純度はLC/MSあるいは元素分析によって>95%純度を確認した。収率は最適化していない。

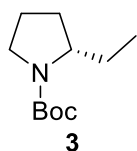
第二章の実験項

tert-Butyl (2*R*)-2-vinylpyrrolidine-1-carboxylate (**2**)



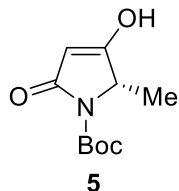
tert-ブチル (2*R*)-2-(ヒドロキシメチル)ピロリジン-1-カルボキシレート **1** (5.10 g, 25.3 mmol) と DMSO (35 mL) の混合物に、トリエチルアミン (12.1 mL, 86.8 mmol) と三酸化硫黄ピリジン複合体 (13.8 g, 86.7 mmol) を 10°Cにおいて加えた。2.5 時間攪拌したのち、氷冷水を加えジクロロメタンで抽出した。有機層を 50%クエン酸水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下濃縮し、粗生成物 (2.30 g, 11.5 mmol, 46%) を無色の油状物として得た。NaH (60%、油分散液) (402 mg, 10.1 mmol) に DMSO (10 mL) を加えた後、55°Cで 1 時間攪拌した。続いて臭化メチルトリフェニルホスホニウム (3.59 g, 10.5 mmol) の DMSO (15 mL) 混合物を加えた。45 分間攪拌した後、混合物を室温に冷却した。得られた混合物を DMSO (30 mL) 中の粗生成物 (2.00 g, 10.0 mmol) に加えた。更に混合物を室温で 15 時間攪拌した。混合物に水を加えた後、ジクロロメタンで抽出した。有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、**2** (191 mg, 0.968 mmol, 9.6 %) を無色油状物として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.44 (9H, s), 1.64–2.10 (4H, m), 3.34–3.45 (2H, m), 4.20–4.38 (1H, m), 5.03–5.06 (2H, m), 5.66–5.80 (1H, m).

***tert*-Butyl (2*S*)-2-ethylpyrrolidine-1-carboxylate (**3**)**



MeOH (3.0 mL) 中の化合物 **2** (110 mg、0.558 mmol) および 10%Pd/C (50%含水物、119 mg) の混合物を、室温、水素雰囲気下で 20 時間攪拌した。混合物をセライトパッドで濾過し、MeOH で洗浄した。濾液を減圧濃縮して **3** (80.0 mg、0.401 mmol、72%) を無色油状物として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.86 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.25–1.37 (1H, m), 1.46 (9H, s), 1.59–1.99 (5H, m), 3.26–3.74 (3H, m).

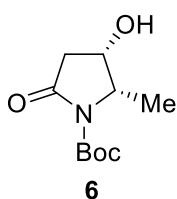
***tert*-Butyl (2*S*)-3-hydroxy-2-methyl-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxylate (**5**)**



N-(*tert*-ブトキシカルボニル)-*L*-アラニン **4** (1,170g、6.17mol) のジクロロメタン (1,000 ml) 溶液に、2,2-ジメチル-1,3-ジオキサン-4,6-ジオン (934 g、6.48 mol) を、0°C において 20 分間かけて少しずつ加えた。次いで、1,1'-カルボニルジイミダゾール (1,200 g、7.40 mol) を 0°C において 30 分間かけて少しずつ加えたのち、混合物を室温で 46 時間攪拌した。その後、5%硫酸水素カリウム水溶液 (50 L) を 0°C で加え、そのまま 10 分間攪拌した。有機層を分離し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣を EtOAc (15 L) に溶解した後 2 時間還流した。0°C に冷却後、5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (30 L) を混合物に加えた。水層を分離し、クエン酸 (2,000 g、10.4 mol) で酸性 (pH = 3-4) にした。混合物を EtOAc (10 L) で 4 回抽出した。有機層を合わせ、飽和

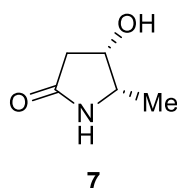
食塩水で洗浄し、MgSO₄で乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣を EtOAc から再結晶して、無色固体として **5** (699 g、3.28 mol、53%) を得た。[α]_D = +85.3° (c = 0.521, MeOH). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.51 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.57 (9H, s), 3.15–3.31 (2H, m), 4.42 (1H, q, *J* = 6.9 Hz).

***tert*-Butyl (2*S*,3*S*)-3-hydroxy-2-methyl-5-oxopyrrolidine-1-carboxylate (**6**)**



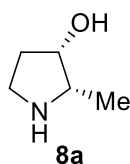
化合物 **5** (698 g、3.27 mol) のジクロロメタン (16 L) 溶液に、酢酸 (1,630 mL、28.4 mol) を−30°C〜−25°Cで 30 分間かけて滴下した。次に、テトラヒドロホウ酸ナトリウム (9.85 g、0.260 mol) を−35°C〜−30°Cで 40 分間かけて少しずつ加えた後、混合物を 0°C で 18 時間攪拌した。氷水 (10 L) を混合物に加え、そのまま 10 分間攪拌した。有機層を分離し、水層に NaCl (1000 g) を加え、EtOAc (10 L) で 3 回抽出した。有機層を合わせ、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣のジクロロメタン (16 L) 溶液に、酢酸 (1,630 mL、28.4 mol) を−30°C〜−25°Cで 30 分間かけて滴下した。次に、テトラヒドロホウ酸ナトリウム (9.85 g、0.260 mol) を−35°C〜−30°Cで 40 分間かけて混合物に少しずつ加え、そのまま 0°C で 18 時間攪拌した。氷水 (10 L) を混合物に加え、10 分間攪拌した。有機層を分離し、水層に NaCl (1000 g) を加え、EtOAc (10 L) で 3 回抽出した。有機層を合わせ、MgSO₄で乾燥させ、減圧濃縮した。残渣 (700g、3.25mol、99%) を IPE から再結晶して **6** (460 g、2.14 mol、65%) を無色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.33 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.53 (9H, s), 2.58 (1H, dd, *J* = 17.1, 8.7 Hz), 2.71 (1H, dd, *J* = 17.1, 8.7 Hz), 4.21–4.30 (1H, m), 4.46–4.54 (1H, m).

(4*S*,5*S*)-4-Hydroxy-5-methylpyrrolidin-2-one (7)



化合物 **6** (459 g, 2.13 mol) の EtOAc (4.6 L) 溶液に、4M HCl-EtOAc 溶液 (1,600 mL, 6.40 mol) を加えた。室温で 1 時間攪拌後、混合物を減圧濃縮した。残渣を MeOH (800 mL) に溶解し、あらかじめ MeOH (3 L) で 3 回洗浄して水を除去した Amberlyst A-21 (1,070 g) を添加した。室温で 2 時間攪拌した後、Amberlyst A-21 を濾去し、MeOH (1.5 L) で 4 回洗浄した。濾液を合わせ、減圧濃縮した。残渣を塩基性シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : MeOH = 4 : 1) を用いて精製し、IPE から再結晶して **7** (207 g, 1.80 mol, 84%) を無色結晶として得た。mp 139 °C–140 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.03 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.95 (1H, dd, *J* = 16.5, 3.3 Hz), 3.52–3.61 (1H, m), 4.10–4.17 (1H, m), 4.93 (1H, d, *J* = 5.1 Hz), 7.50 (1H, br s). Anal. Calcd. for C₅H₉NO₂: C, 52.16; H, 7.88; N, 12.17. Found: C, 52.18; H, 7.83; N, 12.10.

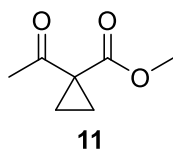
(2*S*,3*S*)-2-Methylpyrrolidin-3-ol (8a)



化合物 **7** (40.0 g, 0.347 mol) の THF (1.6 L) 溶液に、室温で 20 分間かけて水素化ビス (2-メトキシエトキシ) アルミニウムナトリウム (70% トルエン溶液、388 g, 1.34 mol) を加えた後、85 °C で 3 時間攪拌した。0 °C に冷却した後、炭酸ナトリウム十水和物 (159 g, 0.556 mol) を 20 分間かけて少しずつ加え、混合物を室温で一晩攪拌した。不溶物をセライトのパッドを通して濾去し、THF で洗浄した。濾液を減圧濃縮して **8a** (35.0

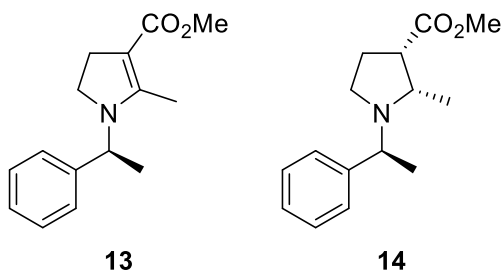
g、0.346 mol、100%) を褐色の油状物として得た。 ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6) δ 0.99 (3H, d, J = 6.6 Hz), 1.50–1.60 (1H, m), 1.78–1.89 (1H, m), 2.49–2.66 (2H, m), 2.89–2.97 (1H, m), 3.83–3.87 (1H, m).

Methyl 1-acetylcyclopropanecarboxylate (**11**)



3-オキソブタン酸メチル (1650 g、14.2 mol)、炭酸カリウム (5,880 g、42.6 mol) 及びアセトン (13.7 L) の混合物を 30 分間還流した。室温に戻した後、1,2-ジブロモエタン (4,000 g、21.3 mol) を 1 時間かけて混合物に滴下し、更に 60 時間還流した。室温に冷却した後、不溶物をセライトパッドで濾去し、 Et_2O で洗浄した。濾液を減圧濃縮し、得られた残渣を蒸留して **11** (983 g、6.92 mol、49%) を無色油状物として得た。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.47 (4H, s), 2.46 (3H, s), 3.74 (3H, s).

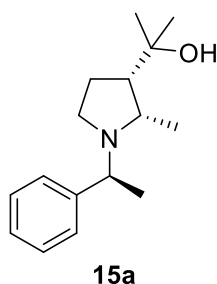
Methyl (2*S*,3*S*)-2-methyl-1-((1*S*)-1-phenylethyl)pyrrolidine-3-carboxylate (**14**)



11 (983 g、6.91 mol)、(1*S*) -1-フェニルエタンアミン (838 g、6.91 mol) および p-トルエンスルホン酸一水和物 (65.8 g、0.346 mol) のトルエン (12.3 L) 混合物を、ディーンスタークトラップを用いて、40 時間還流した。混合物を室温に冷却し、不溶性部分をセライトパッドで濾去した。濾液を減圧下で濃縮して **13** を得た。PtO₂ (6.39 g、28.1

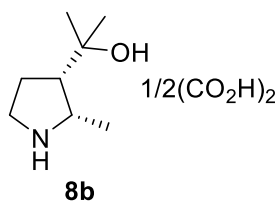
mol) を、**13** の MeOH (7.0 L) 溶液に添加し、混合物を水素雰囲気下、室温で 60 時間攪拌した。不溶物をセライトパッドで濾去し、濾液を減圧濃縮した。残渣を塩基性シリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：EtOAc=9：1）を用いて精製し、ヘキサンで洗浄して **14** (643 g、2.60 mol、38%) を無色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.79 (3H, d, *J* = 6.3 Hz), 1.35 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.82–1.93 (1H, m), 2.11–2.24 (1H, m), 2.54 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 2.70 (1H, td, *J* = 9.3 and 3.9 Hz), 3.02–3.15 (1H, m), 3.44–3.62 (2H, m), 3.67 (3H, s), 7.21–7.36 (5H, m).

2-((2*S*,3*S*)-2-Methyl-1-((1*S*)-1-phenylethyl)pyrrolidin-3-yl)propan-2-ol (15a**)**



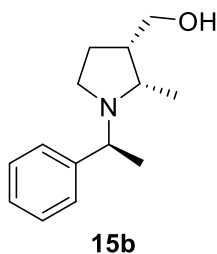
化合物 **14** (643 g、2.60 mol) の無水 THF (9.19 L) 溶液に、アルゴン雰囲気下、-78°C で 3M 臭化メチルマグネシウムジエチルエーテル溶液 (2,570 mL、7.72 mol) を滴下した。30 分間攪拌した後、混合物を室温に戻し、更に 3 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液 (15 L) を混合物に加え、EtOAc (18 L) で抽出した。有機層を飽和食塩水 (15 L) で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮して **15a** (643 g、2.60 mol、100%) を淡黄色の油状物として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.03 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.22 (3H, s), 1.32 (3H, s), 1.34 (3H, d, *J* = 6.3 Hz), 1.70–1.89 (2H, m), 2.11–2.19 (1H, m), 2.44–2.58 (2H, m), 3.38 (1H, qui, *J* = 6.3 Hz), 3.60 (1H, q, *J* = 6.6 Hz), 7.19–7.35 (5H, m).

2-((2*S*,3*S*)-2-Methylpyrrolidin-3-yl)propan-2-ol 0.5 oxalic acid salt (8b**)**



化合物 **15a** (710 g、2.87 mol) の MeOH (10.2 L) 溶液に、10%Pd / C (50%含水、56.0 g) を添加し、混合物を室温、水素雰囲気下において 40 時間攪拌した。不溶物をセライトパッドで濾去し、濾液を減圧濃縮した。残渣を MeOH (5.0 L) に溶解し、シュウ酸 (164 g、1.82 mol) を加えた。混合物を減圧下で濃縮し、残渣を Et₂O 中で再結晶させて **8b** (433 g、2.30 mol、80%) を無色固体として得た。mp 120 °C–122 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.12–1.13 (6H, m), 1.17 (3H, s), 1.74–2.08 (3H, m), 3.01–3.19 (2H, m), 3.56–3.65 (1H, m). Anal. Calcd. for C₈H₁₇NO₂·0.5 C₂H₄O₂·0.5 H₂O: C, 54.80; H, 9.71; N, 7.10. Found: C, 54.43; H, 9.44; N, 6.76.

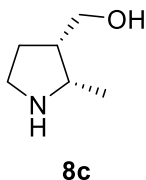
((2S,3S)-2-Methyl-1-((1S)-1-phenylethyl)pyrrolidin-3-yl)methanol (15b**)**



化合物 **14** (740 mg、2.99 mmol) の THF (8.0 mL) 混合物に、水素化リチウムアルミニウム (114 mg、3.00 mmol) を 0°C で加えた後、0°C で 3 時間攪拌した。0°C で水 (0.11 mL)、25%水酸化カリウム水溶液 (0.11 mL)、水 (0.33 mL) を加えた後、室温で 15 時間攪拌した。不溶物をセライトパッドで濾去し、濾液を減圧下で濃縮して **15b** (656 mg、2.99 mmol、100%) を淡黄色の油状物として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.14 (3H, d, *J* = 6.3 Hz), 1.29 (3H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.67–1.79 (1H, m), 1.85–1.97 (1H, m), 2.04–2.09 (1H, m), 2.36–2.46 (1H, m), 2.62 (1H, td, *J* = 9.9, 3.6 Hz), 2.87–2.95 (1H, m), 3.47 (1H, dd, *J* = 9.9,

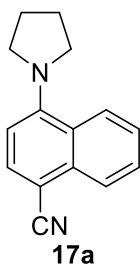
3.3 Hz), 3.86–3.99 (2H, m), 7.22–7.33 (5H, m).

((2S,3S)-2-Methylpyrrolidin-3-yl)methanol (8c)



化合物 **15b** (581 mg、2.65 mmol) および 10%Pd/C (50%水和物、564 mg) の MeOH (9.0 mL) 混合物を、室温、水素雰囲気下において 20 時間攪拌した。不溶物をセライトパッドで濾去し、濾液を減圧下で濃縮して **8c** (260 mg、2.26 mmol、85%) を淡黄色の油状物として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.23 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.76–1.87 (1H, m), 1.96–2.10 (2H, m), 2.82–2.90 (1H, m), 3.06–3.23 (2H, m), 3.56 (1H, dd, *J* = 10.2, 4.2 Hz), 3.81 (1H, dd, *J* = 10.2, 4.2 Hz).

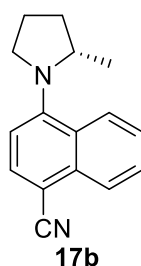
4-(Pyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (17a)



ピロリジン (0.127 mL、1.52 mmol)、4-フルオロ-1-ナフトニトリル **16** (200 mg、1.17 mmol) および炭酸カリウム (484 mg、3.51 mmol) の DMSO (10 mL) 混合物を 100°C で 20 時間攪拌した。混合物を室温に冷却し、水を加えた後 EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、EtOAc-ヘキサンから再結晶化させて **17a** (187 mg、0.840 mmol、72%) を淡黄色結晶として得た。mp 109 °C–110 °C. ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃)

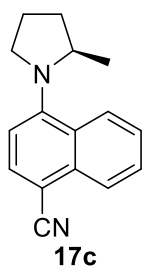
δ 2.01–2.08 (4H, m), 3.59–3.66 (4H, m), 6.69 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.39–7.48 (1H, m), 7.55–7.62 (1H, m), 7.72 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.13–8.17 (1H, m), 8.26 (1H, d, $J = 8.2$ Hz). IR (KBr) 2203, 1563, 1518 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{N}_2$: C, 81.05; H, 6.35; N, 12.60. Found: C, 80.99; H, 6.33; N, 12.47.

4-((2*S*)-2-Methylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17b**)



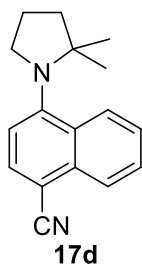
tert-ブチル (2*S*) -2-メチルピロリジン-1-カルボキシレート (1.25 g, 6.75 mmol) のトルエン (2.0 mL) 混合物に、TFA (4.0 mL) を加え、室温で 5 時間攪拌した。混合物を減圧濃縮し、残渣を DMSO (10 mL) に溶解した。この溶液に 4-フルオロ-1-ナフトニトリル **16** (0.855 g, 5.00 mmol) および炭酸カリウム (2.80 g, 20.2 mmol) を加え、100°C で 5 時間攪拌した。混合物を室温に冷却した後、水を加え EtOAc で抽出した。有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、ヘキサンで洗浄して **17b** (0.780 g, 3.30 mmol, 66%) を淡黄色固体として得た。mp 73 °C–74 °C. $[\alpha]_D = -251.5^\circ$ ($c = 0.470$, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.18 (3H, d, $J = 5.8$ Hz), 1.60–2.15 (3H, m), 2.20–2.40 (1H, m), 3.25–3.40 (1H, m), 3.90–4.15 (2H, m), 6.82 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.40–7.70 (2H, m) 7.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.15–8.25 (2H, m). IR (KBr) 2209, 1565, 1514, 1327, 763 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2$: C, 81.32; H, 6.82; N, 11.85. Found: C, 81.35; H, 6.87; N, 11.84.

4-((2*R*)-2-methylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17c**)



2-メチルピロリジン (3.00 g、35.2 mmol)、**16** (5.00 g、29.2 mmol) および炭酸カリウム (5.00 g、36.2 mmol) の DMSO (30 mL) 混合物を 100°C で 5 時間撹拌した。混合物を室温に冷却し、水を加えた後 EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、4-(2-メチルピロリジン-1-イル)-1-ナフトニトリル (4.76 g、20.1 mmol、69%) を得た。光学活性 HPLC を用いて 4-(2-メチルピロリジン-1-イル)-1-ナフトニトリル (1.08 g、4.57 mmol) を分割して光学的に純粋な **17b** (804 mg、3.40 mmol、48%) および **17c** (805 mg、3.41 mmol、48%) を得た。[Column: CHIRALPAK AS (50 mm × 500 mm); column temperature, 25 °C; mobile phase, hexane:EtOH = 97:3; flow rate, 60 mL/min; UV detection at 254 nm]. **17c** $[\alpha]_D = +257.7^\circ$ ($c = 0.410$, MeOH). Analytical HPLC showed 99.5% purity.

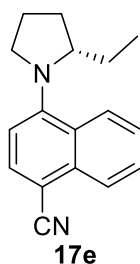
4-(2,2-Dimethylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17d**)



1M HCl 水溶液 (4.00 mL、4.00 mmol) および MeOH (40 mL) に 1-ベンジル-2,2-ジメチルピロリジン (0.750 g、3.96 mmol) を加えた後、10% Pd / C (50% 含水、0.40 g)、を加え、室温、水素雰囲気下において 18 時間撹拌した。不溶物をセライトパッドで濾

去し、濾液を減圧濃縮した。残渣を DMSO (6.0 mL) および **16** (0.260 g、1.52 mmol) に溶解し、炭酸カリウム (0.830 g、6.01 mmol) を加えた。100°Cで 20 時間攪拌した後、混合物を室温に冷却し、水を加えた後 EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、**17d** (46.0 mg、0.184 mmol、12%) を黄色の油状物として得た。¹H NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 1.17 (6H, s), 1.90–2.15 (4H, m), 7.34 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.48–7.70 (2H, m), 7.83 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.14–8.22 (1H, m), 8.42–8.49 (1H, m). IR (KBr) 2218, 1570 cm⁻¹. Analytical HPLC showed 98.0% purity.

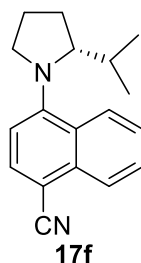
4-((2*S*)-2-Ethylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17e**)



化合物 **3** (70.0 mg、0.351 mmol) の 4 M HCl-EtOAc 溶液 (1.00 mL、4.00 mmol) を室温で 1.5 時間攪拌した。減圧下で濃縮した後、残渣をヘキサンで洗浄して無色の固体を得た。この固体に DMSO (1.0 mL) を加えた後、化合物 **16** (50.0 mg、0.292 mmol) および炭酸カリウム (104 mg、0.753 mmol) を加え、100°Cで 3 時間攪拌した。室温に冷却した後、水を加え EtOAc で抽出した。有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、**17e** (33.0 mg、0.132 mmol、38%、24.4%ee) を得た。これを HPLC により分割して、光学的に純粋な **17e** (16.0mg、63.9μmol、18%、99.1%ee) を黄色油状物として得た。[Column: CHIRALPAK AS (50 mm × 500 mm); column temperature, 25 °C; mobile phase, hexane:EtOH = 95:5; flow rate, 60 mL/min; UV detection at 254 nm]. [α]_D = -294.6° (*c* = 0.330, MeOH). ¹H

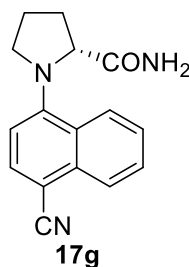
NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.90 (3H, t, $J = 7.8$ Hz), 1.30–1.45 (1H, m), 1.68–1.86 (3H, m), 1.95–2.05 (1H, m), 2.26–2.34 (1H, m), 3.32–3.38 (1H, m), 3.83–3.92 (1H, m), 3.95–4.03 (1H, m), 6.79 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.45 (1H, ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.2$ Hz), 7.59 (1H, ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.2$ Hz), 7.73 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 8.13–8.18 (2H, m). IR (KBr) 2963, 2209, 1564 cm^{-1} . Analytical HPLC showed 99.4% purity.

4-((2*R*)-2-Isopropylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17f**)



HCl 水溶液の代わりに酢酸を使用して、**17d** について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 28%、淡黄色油状物として得た。 $[\alpha]_D = -337.2^\circ$ ($c = 0.776$, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 0.81 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 0.94 (3H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.60–2.20 (5H, m), 3.30–3.46 (1H, m), 3.88–4.08 (2H, m), 6.85 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.40–7.68 (2H, m), 7.73 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 8.10–8.22 (2H, m). IR (KBr) 2210, 1566 cm^{-1} . Analytical HPLC showed 98.9% purity.

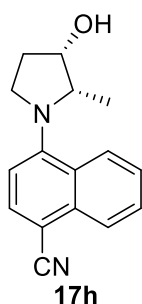
1-(4-Cyano-1-naphthyl)-D-prolinamide (**17g**)



17a について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 37%、無色結晶

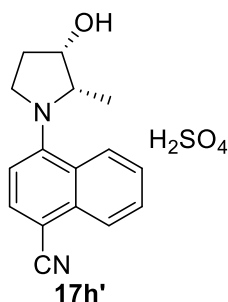
として得た。mp 176 °C–177 °C. $[\alpha]_D = -194.6^\circ$ ($c = 0.380$, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.82–2.30 (3H, m), 2.50–2.72 (1H, m), 3.30–3.42 (1H, m), 4.10–4.48 (2H, m), 5.29 (1H, br s), 6.38 (1H, br s), 6.97 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.50–7.75 (2H, m), 7.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.20–8.32 (2H, m). IR (KBr) 2210, 1690, 1568 cm^{-1} . Analytical HPLC showed 96.9% purity.

4-((2*S*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17h**)



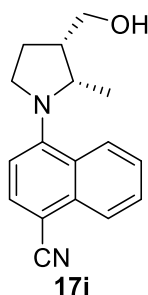
17a について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 65%、黄色油状物として得た。A method similar to that described for **17a** was used to prepare this compound in 65% yield as a yellow oil. $[\alpha]_D = -270.2^\circ$ ($c = 0.618$, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.25 (3H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.93 (1H, d), 2.00–2.20 (2H, m), 3.18–4.02 (1H, m), 4.20–4.40 (1H, m), 4.40–4.58 (1H, m), 6.86 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.46–7.70 (2H, m), 7.78 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.12–8.28 (2H, m). IR (KBr) 2211, 1565, 1515 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}$: C, 76.16; H, 6.39; N, 11.10. Found: C, 76.06; H, 6.41; N, 11.00.

4-((2*S*,3*S*)-3-Hydroxy-2-methylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile sulfate (**17h'**)



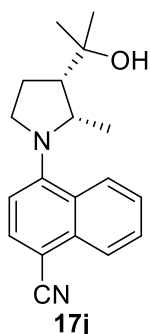
17h (20.0 mg、79.2 μmol) の EtOAc (1.0 mL) 溶液に、硫酸 (0.500 mL、9.38 mmol) の EtOAc (0.3 mL) 溶液を室温で添加した。1 時間攪拌した後、混合物を減圧濃縮した。得られた残渣を EtOAc から再結晶化して **17h'** (18 mg、51.4 μmol 、65%) を無色の固体として得た。mp 111 °C–112 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -144.0^\circ$ ($c = 0.270$, MeOH). ^1H NMR (DMSO- d_6) δ 1.10 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 1.86–1.93 (2H, m), 3.25–3.31 (1H, m), 3.96–4.04 (1H, m), 4.21–4.32 (2H, m), 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.55 (1H, ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.2$ Hz), 7.70 (1H, ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.2$ Hz), 7.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.97–8.00 (1H, m), 8.23–8.26 (1H, m). IR (KBr) 2228, 1223 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 1.2 \text{H}_2\text{O}$: C, 51.66; H, 5.53; N, 7.53. Found: C, 51.60; H, 5.52; N, 7.62.

4-((2*S*,3*S*)-3-(Hydroxymethyl)-2-methylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17i**)



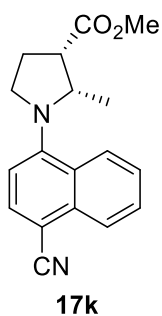
17a について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 30%、淡黄色固体として得た。mp 158 °C–159 °C. $[\alpha]_{\text{D}} = -258.9^\circ$ ($c = 0.320$, MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.44 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 1.99–2.20 (3H, m), 2.55–2.66 (1H, m), 3.01–3.09 (1H, m), 3.79–4.02 (3H, m), 4.11 (1H, qui, $J = 6.3$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.54 (1H, ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.5$ Hz), 7.65 (1H, ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.5$ Hz), 7.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 8.14–8.21 (2H, m). IR (KBr) 2211, 1568, 1323 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O} \cdot 0.2 \text{H}_2\text{O}$: C, 75.64; H, 6.87; N, 10.38. Found: C, 75.77; H, 6.83; N, 10.46.

4-((2*S*,3*S*)-3-(2-Hydroxypropan-2-yl)-2-methylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (17j)



炭酸カリウムの代わりに炭酸リチウムを使用し、**17a** について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 73%、無色固体として得た。mp 67 °C. $[\alpha]_D = -229.0^\circ$ ($c = 1.000$, MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 0.98 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.27 (1H, s), 1.34 (3H, s), 1.39 (3H, s), 2.13–2.21 (2H, m), 2.49–2.58 (1H, m), 3.26–3.34 (1H, m), 3.76–3.84 (1H, m), 4.39–4.48 (1H, m), 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.49–7.54 (1H, m), 7.60–7.65 (1H, m), 7.77 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 8.10–8.13 (1H, m), 8.16–8.19 (1H, m). IR (KBr) 2211, 1569 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}$: C, 77.52; H, 7.53; N, 9.52. Found: C, 77.50; H, 7.71; N, 9.52.

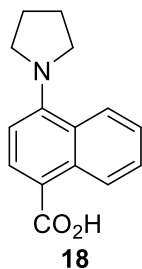
Methyl (2*S*,3*S*)-1-(4-cyano-1-naphthyl)-2-methylpyrrolidine-3-carboxylate (17k)



17d について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 22%、無色油状物として得た。 $[\alpha]_D = -236.3^\circ$ ($c = 0.408$, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.03 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 2.00–2.52 (2H, m), 3.10–3.48 (2H, m), 3.76 (3H, s), 4.05–4.45 (2H, m), 6.93 (1H, d, $J = 8.6$ Hz), 7.50–7.70 (2H, m), 7.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.14–8.28 (2H, m). IR (KBr) 2213, 1737,

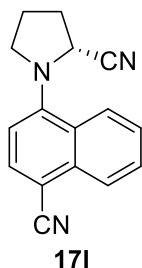
1570 cm⁻¹. Analytical HPLC showed 95.9% purity.

4-(Pyrrolidin-1-yl)-1-naphthoic acid (**18**)



4- (ピロリジン-1-イル) -1-ナフトニトリル **17a** (1.76 g, 7.92 mmol)、2M 水酸化カリウム水溶液 (2.70 mL、5.40 mmol)、EtOH (2.7 mL) の混合物を、100°Cで 2 日間攪拌した。不溶物をセライトパッドで濾去し、濾液を 1M HCl 水溶液で酸性化した。混合物を EtOAc で抽出し、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ減圧濃縮した。残渣を Et₂O で洗浄して **18** (17.0 mg、70.5 μmol、0.89%) を褐色固体として得た。mp 194 °C. ¹H NMR (200 MHz, DMSO-d₆) δ 1.94–2.00 (4H, m), 3.48–3.54 (4H, m), 6.82 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.38–7.47 (1H, m), 7.50–7.58 (1H, m), 8.09 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.22–8.26 (1H, m), 9.05–9.09 (1H, m), 12.27 (1H, br s). Analytical HPLC showed 99.7% purity.

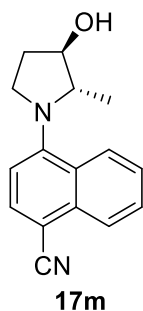
(2*R*)-1-(4-Cyano-1-naphthyl)pyrrolidine-2-carbonitrile (**17l**)



17g (160 mg、0.603 mmol) のジクロロメタン (10 mL) 溶液に、無水トリフルオロ酢酸 (0.250 mL、180 mmol) およびトリエチルアミン (0.560 mL、4.02 mmol) を加え、混合物を室温で 0.5 時間攪拌した。混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で塩基性に

し、EtOAc で抽出した。有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、**17l** (113 mg、0.457 mmol、76%) を黄色粉末として得た。 $[\alpha]_D^{25} = +92.3^\circ$ ($c = 0.39$, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 2.00–2.72 (4H, m), 3.35–3.50 (1H, m), 3.65–3.82 (1H, m), 4.70–4.80 (1H, m), 7.18 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.55–7.80 (2H, m), 7.88 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.04–8.15 (1H, m), 8.20–8.32 (1H, m). IR (KBr) 2216, 1573 cm^{-1} . Analytical HPLC showed 98.4% purity.

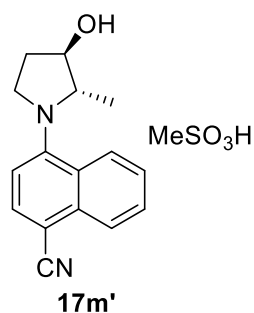
4-((2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17m**)



化合物 **17h** (1.00 g、3.96 mmol)、3,4-ジメトキシ安息香酸 (1.08 g、5.95 mmol)、トリフェニルホスフィン (3.28 g、12.5 mmol) のトルエン (30 mL) 溶液に、アゾジカルボン酸ジエチル (40%トルエン溶液、5.17 g、11.9 mmol) を窒素雰囲気下、室温で滴下した。室温で 16 時間攪拌した後、不溶性部分をセライトパッドで濾去し、トルエンで洗浄した。濾液を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。残渣を MeOH で洗浄して、(2*S*,3*R*) -1- (4-シアノ-1-ナフチル) -2-メチルピロリジン-3-イル-3,4-ジメトキシベンゾエート (975 mg、2.34 mmol、59%) を無色の固体として得た。(2*S*,3*R*) -1- (4-シアノ-1-ナフチル) -2-メチルピロリジン-3-イル-3,4-ジメトキシベンゾエート (950 mg、2.28 mmol) を MeOH (35 mL) および THF (9 mL) に溶解した後、1M 水酸化ナトリウム水溶液 (6.84 mL、6.84 mmol) を加え、混合物を室温で 1 時間攪拌した。混合物に飽和食塩水を加え、IPE で 2 回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩

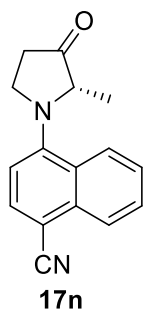
水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、**17m** (549 mg, 2.18 mmol, 95%) を淡黄色油状物として得た。 $[\alpha]_D = -268.6^\circ$ ($c = 0.515$, MeOH). ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3) δ 1.15 (3H, d, $J = 6.2$ Hz), 1.80–2.20 (2H, m), 2.30–2.50 (1H, m), 3.20–3.38 (1H, m), 3.77–4.00 (2H, m), 4.10–4.30 (1H, m), 6.89 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.46–7.68 (2H, m), 7.19 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 8.14–8.26 (2H, m). IR (KBr) 2211, 1567, 1514 cm^{-1} . Analytical HPLC showed 99.0% purity.

4-((2*S*,3*R*)-3-Hydroxy-2-methylpyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile methanesulfonate (**17m'**)



化合物 **17m** (280 mg, 1.11 mmol) の THF (1.0 mL) 溶液に、メタンスルホン酸 (72.0 μL , 1.11 mmol) を室温で添加した。Et₂O を混合物に添加し、析出した固体を濾取し **17m'** (205 mg, 0.588 mmol, 53%) を無色の固体として得た。mp 107 °C–108 °C. $[\alpha]_D = -174.5^\circ$ ($c = 0.350$, MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.44 (3H, d, $J = 6.3$ Hz), 2.40–2.50 (1H, m), 2.80–2.90 (1H, m), 2.89 (3H, s), 3.98–4.36 (3H, m), 4.58–4.64 (1H, m), 7.83–7.94 (3H, m), 8.02 (1H, d, $J = 7.8$ Hz), 8.37–8.40 (1H, m), 8.68–8.71 (1H, m). IR (KBr) 3320, 2228, 1194 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{CH}_3\text{SO}_3\text{H} \cdot 0.1 \text{H}_2\text{O}$: C, 58.30; H, 5.81; N, 8.00. Found: C, 58.13; H, 5.77; N, 7.97.

4-((2*S*)-2-Methyl-3-oxopyrrolidin-1-yl)-1-naphthonitrile (**17n**)



DMSO (0.220 mL、3.10 mmol) とジクロロメタン (4.0 mL) の混合物に、アルゴン雰囲気下、塩化オキサリル (0.140 mL、1.61 mmol) を -78°C で加えた。10 分間攪拌した後、ジクロロメタン (2.0 mL) 中の **17m** (210 mg、0.832 mmol) の溶液を滴下した。混合物を 15 分間攪拌し、続いてトリエチルアミン (0.570 mL、4.09 mmol) を添加した。 -78°C で 10 分間攪拌した後、混合物を室温に戻した。混合物に水を注ぎ、EtOAc で抽出した。有機層を水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、**17n** (150 mg、0.599 mmol、73%) を無色固体として得た。mp 113°C – 114°C . $[\alpha]_{\text{D}} = -253.9^{\circ}$ ($c = 0.270$, MeOH). ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.17 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 2.69 (1H, ddd, $J = 18.0, 7.5, 4.2$ Hz), 2.79 (1H, dt, $J = 18.0, 7.8$ Hz), 3.15 (1H, ddd, $J = 9.9, 7.8, 7.5$ Hz), 3.89 (1H, q, $J = 6.6$ Hz), 4.07 (1H, ddd, $J = 9.9, 7.8, 4.2$ Hz), 7.09 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.63 (1H, ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.2$ Hz), 7.71 (1H, ddd, $J = 8.4, 6.9, 1.2$ Hz), 7.89 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 8.24–8.28 (2H, m). IR (KBr) 2216, 1759, 1574 cm^{-1} . Anal. Calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$: C, 76.78; H, 5.64; N, 11.19. Found: C, 76.52; H, 5.63; N, 11.30.

Biology

AR 結合阻害試験

野生型アンドロゲン受容体(AR)を含む溶液に 3 nM のラジオリラベルミボレロン ([17 α -Methyl- ^3H]-)、および化合物を加え、 4°C で 3 時間インキュベーションした後、デキス

トラン/チャーコール法 (DCC) にて B (Bound)/F (Free)分離した。B のラベルカウントを測定し、化合物の IC₅₀ 値を算出した。

AR レポーターアッセイ

150 cm² のフラスコに Cos-7 細胞 (5×10⁶ の密度) を播種し、培養液[DCC (Dextran-coated charcoal) 処理したウシ胎児血清(FBS)を 10%含む DMEM 培地]中で 24 時間培養した。マウス乳癌ウイルス (MMTV) に由来するアンドロゲン応答性プロモーターの下流に結合した AR 遺伝子を含むベクターDNA およびルシフェラーゼ遺伝子を含むベクターDNA を、リポソーム法を用いてコトランスフェクションした。4 時間培養した後、細胞を採取し、10,000 細胞を 96 穴プレートに播種し、3 時間培養した。アゴニストアッセイでは、DHT または化合物を添加し、細胞をさらに 24 時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。アンタゴニストアッセイでは、DHT (0.1 μM) および化合物を添加し、細胞をさらに 24 時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した (Bright-Glo Luciferase assay kit (Promega), Wallac 1420 ARVO MX multi-label counter (Perkin Elmer))。化合物による阻害率は、DHT (0.1 μM) の添加によって誘導されるルシフェラーゼ活性を 100 と設定することによって計算した。

動物

4~8 週齢の雄性 CD (SD) IGS ラット、及び 8 週齢の雌性 Wistar Imamichi ラットを、それぞれ Charles River Japan、CLEA Japan、Inc.から購入した。これらの動物を一定温度 (25°C) で 12 時間/12 時間明/暗サイクル (0800 時間点灯) に維持し、不断給餌・給水とした。毎朝雌ラットの膣内検査を行い、性行為実験のために 4 日間の定期的な月経周期を有する個体を選択した。両睾丸摘除術はエーテル麻酔下で行った。

試薬

化学薬品および溶媒は試薬グレードのものをを用いた。皮下投与は、化合物を 0.5% メチルセルロース（メトローズ、信越化学工業株式会社、日本）の経口投与用水溶液に懸濁させるか、または 20%安息香酸ベンジル（和光純薬工業（株））を含有するコーン油（日本食品化工（株））に溶解させて行った。

幼若ラットを用いた Hershberger アッセイ ¹⁷

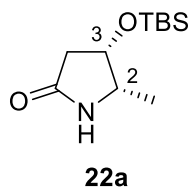
4 週齢の雄 CD (SD) IGS ラットを化合物の臓器選択的作用を評価するために使用した。化合物の投与を開始する 5 日前にラットを去勢した。化合物を 1 日 2 回、4 日間経口投与した。同時に 0.5 mg/kg/day のテストステロンプロピオネート (TP) を投与した。最終投与の翌日、動物をエーテル麻酔下で心臓から血液を採取して屠殺し、腹側および背側の前立腺、体液（両側）を有する精囊、および肛門挙筋を摘出して秤量した。**17h'**および**17m'**は、それぞれ**17h**および**17m**の代わりに使用された。**17h'**および**17m'**の量は、図 3 に示すフリー体**17h**および**17m**の用量となるように計算した。

性行動惹起試験

雄性 CD (SD) IGS ラットを 9 週齢で去勢し、DHEA ペレット (1.5 mg、21 日放出; Innovative Research of America、Sarasota、FL) の皮下移植を、12 週齢、エーテル麻酔下で行った。ペレット移植の翌日、化合物による処置を開始した。性行動惹起試験は、最初の化合物投与から、18~21 日後に開始した。以下の試験手順を使用した。各雄ラットをプラスチックケージに入れた。5 分後、定期的な 4 日間の月経周期を有する 16 週齢の発情前期雌ラットを同居させ、その対を一晩一緒にケージに収容した。交配後少なくとも 9 日間、膣内を毎日検査して偽妊娠率を決定した。

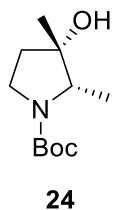
第三章の実験項

(2*S*,3*S*)-3-{{*tert*-Butyl(dimethyl)silyl}oxy}-2-methylpyrrolidin-5-one (22a)



(2*S*,3*S*) -3-ヒドロキシ-2-メチルピロリジン-5-オン **21** (14.8 g、129 mmol) の THF (50 mL) 溶液に、イミダゾール (10.5 g、154 mmol) および *tert*-ブチルジメチルシリルクロリド (21.3 g、141 mmol) を 0°C で加え、混合物を室温で 18 時間攪拌した。次いで、混合物に水を加え、EtOAc で抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 2 : 1 ~ 0 : 1) を用いて精製し、**22a** (21.9 g、95.5 mmol、74%) を無色固体として得た。 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.07 (6H, s), 0.90 (9H, s), 1.17 (3H, d, *J* = 6.3 Hz), 2.27 (1H, dd, *J* = 16.5, 4.2 Hz), 2.52 (1H, dd, *J* = 16.5, 9.3 Hz), 3.70-3.80 (1H, m), 4.37-4.45 (1H, m), 6.00 (1H, br s).

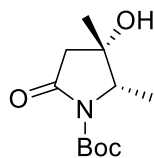
(2*S*,3*S*)-*tert*-Butyl 3-hydroxy-2,3-dimethylpyrrolidine-1-carboxylate (24)



(2*S*,3*S*) -2,3-ジメチルピロリジン-3-オール 1/2 シュウ酸塩 (**23**) (3.31 g、20.7 mmol) の THF (50 mL) 溶液に、1M NaOH 水溶液 (40 mL、40 mmol) および Boc₂O (5.42 g、24.8 mmol) の THF (10 mL) 溶液を 0°C で加えた。室温で 20 時間攪拌した後、水 (50

mL) を室温で反応混合物に添加した。得られた混合物を EtOAc で 2 回抽出した。合わせた有機層を水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 9 : 1~3 : 2) を用いて精製し、**24** (3.21 g、14.9 mmol、72%) を白色粉末として得た。さらに、EtOAc / n-ヘキサンから再結晶し、**24** (2.43 g、11.4 mmol、55%) を無色プリズム晶として得た。mp 109–112 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.33 (3H, s), 1.46 (9H, s), 1.66 (1H, s), 1.73–1.85 (1H, m), 1.86–1.98 (1H, m), 3.40 (2H, dd, *J* = 7.2, 6.7 Hz), 3.46–3.57 (1H, m). IR (KBr) 3430, 2965, 2936, 2878, 1688, 1472, 1402, 1338, 1252, 1216, 1170, 1091, 1019, 988, 934, 919 cm⁻¹. Anal. Calcd for C₁₁H₂₁NO₃: C, 61.37; H, 9.83; N, 6.51. Found: C, 61.46; H, 9.76; N, 6.46.

(2*S*,3*S*)-*tert*-Butyl 3-hydroxy-2,3-dimethyl-5-oxopyrrolidine-1-carboxylate (25**)**

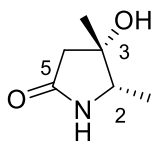


25

化合物 **24** (3.05 g、14.2 mmol) の EtOAc (45 mL) および水 (68 mL) 溶液に、室温で RuO₂ · H₂O (566 mg、4.25 mmol) および NaIO₄ (4.57 g、21.3 mmol) を加えた。室温で 1.5 日間攪拌した後、有機層を分離し、水層を EtOAc で抽出した。合わせた有機層に、i-PrOH (0.7 mL) を添加した。得られた混合物を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 9 : 1~3 : 2) で精製し、**25** (1.11g、4.83mmol、34%) を白色粉末として得た。さらに、EtOAc / n-ヘキサンからの再結晶により、無色プリズム晶 **25** を得た。mp 122–125 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.34 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 1.46 (3H, s), 1.54 (9H, s), 1.72 (1H, s), 2.47 (1H, d, *J* = 17.0 Hz), 2.73 (1H, d, *J* = 17.0 Hz), 3.91 (1H, q, *J* = 6.4 Hz); IR (KBr) 3465, 2970, 2935, 2874,

1773, 1680, 1539, 1473, 1457, 1370, 1339, 1287, 1257, 1161, 1083, 1053, 1035, 1024, 1005, 966, 935 cm^{-1} . Anal. Calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: C, 57.62; H, 8.35; N, 6.11. Found: C, 57.61; H, 8.33; N, 5.93.

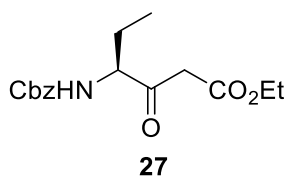
(2*S*,3*S*)-3-Hydroxy-2,3-dimethylpyrrolidin-5-one (22b)



22b

25 (1.00 g, 4.36 mmol) の 4 M HCl EtAc (10 mL, 40 mmol) 溶液を室温で 14 時間攪拌した。次いで、混合物を減圧濃縮した。得られた残渣を *i*-PrOH/*n*-ヘキサンから再結晶して、淡赤色プリズムとして **22b** (309 mg, 2.40 mmol, 55%) を得た。濾液を減圧濃縮した、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : MeOH = 1 : 0~9 : 1) で精製し、**22b** (220 mg, 1.70 mmol, 39%、合計 529 mg, 4.10 mmol, 94%) を白色粉末として得た。mp 169–173 °C. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.00 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 1.20 (3H, s), 2.06 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 2.23 (1H, d, $J = 16.2$ Hz), 3.33 (1H, q, $J = 6.4$ Hz), 4.70 (1H, br s), 7.48 (1H, br s); IR (KBr) 3390, 3191, 2955, 2912, 2858, 1675, 1436, 1377, 1332, 1311, 1258, 1222, 1145, 1125, 1105, 1092, 1019, 939 cm^{-1} . MS (m/z): 130 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$. Anal. Calcd for $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$: C, 55.80; H, 8.58; N, 10.84. Found: C, 55.62; H, 8.42; N, 10.72.

Ethyl (4*S*)-4-[(benzyloxy)carbonyl]amino}-3-oxohexanoate (27)

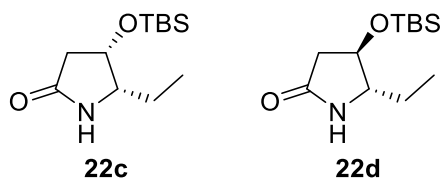


27

ジイソプロピルアミン (44.3 mL, 311 mmol) の THF (100 mL) 溶液に、1.6M *n*-ブチル

リチウムヘキサン溶液 (198 mL、317 mmol) を -78°C で滴下した。 -78°C で 1 時間攪拌した後、EtOAc (30.9 mL、316 mmol) を -78°C で滴下した。混合物を -78°C で 1 時間攪拌した。次いで、(2*S*)-2-[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ}ブタン酸 (**26**、25.0 g、105 mmol)、およびカルボニルジイミダゾール (20.5 g、126 mmol) の THF (100 mL) 溶液から調製した化合物の溶液を、 -78°C で混合物に滴下した。 -78°C で 1 時間攪拌した後、酢酸 (25 mL) を加えて反応を停止させ、室温に戻した。混合物に水を加え、EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン→n-ヘキサン:EtOAc=2:1) で精製し、**27** (20.0 g、65.1 mmol、62%) を無色油状物として得た。 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0.92 (3H, t, $J=7.5$ Hz), 1.27 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 1.60–1.72 (1H, m), 1.91–2.09 (1H, m), 3.47–3.61 (2H, m), 4.11–4.25 (2H, m), 4.40–4.51 (1H, m), 5.11 (2H, s), 5.41 (1H, d, $J=7.0$ Hz), 7.31–7.39 (5H, m).

(2*S*,3*S*)-3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-ethylpyrrolidin-5-one (22c**) and (3*R*,2*S*)-3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-ethylpyrrolidin-5-one (**22d**)**



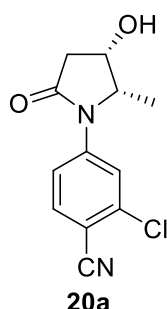
27 (70.7 g、230 mmol) の MeOH (500 mL) 溶液に、 -78°C で水素化ホウ素ナトリウム (9.66 g、255 mmol) を加えた。混合物を -78°C で 1 時間攪拌した後、室温に戻して更に 1 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を反応混合物に加え、EtOAc で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) を用いて精製し、(4*S*)-4-[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ-3-ヒドロキシヘキサン酸エチル (63.2 g、204 mmol、89%) を得た。MS (m/z):

310 (M+H)。 (4S) -4-{[(ベンジルオキシ)カルボニル]アミノ}-3-ヒドロキシヘキサン酸エチル (63.2 g, 204 mmol) および 2,6-ルチジン (47.6 mL, 423 mmol) の THF (800 mL) 溶液に、0℃で *tert*-ブチルジメチルシラントリフルオロメタンスルホネート (70 mL, 305 mmol) を加えた。室温に戻した後、混合物を 1 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、混合物を EtOAc で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 1 : 0~1 : 1) で精製し、(4S) -4 - {[ベンジルオキシ]カルボニル}アミノ}-3- (*tert*-ブチルジメチルシリルオキシ) ヘキサン酸エチル (**28**) を無色油状物として得た (64.0 g, 151 mmol, 74%)。 MS (m/z) : 424 (M+H)⁺。 **28** (64.0 g, 151 mmol) の MeOH (500 mL) 溶液に、10% Pd/C (50%含水、6.5 g) を加え、水素雰囲気下、室温で 3.5 時間攪拌した。不溶物をセライトパッドで濾去した。濾液にナトリウムメトキシド (13.6 g, 252 mmol) を加え、混合物を室温で 1 時間攪拌した。反応混合物に水を加え、混合物を EtOAc で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 20 : 1~1 : 4) で精製して **22c** (4.64 g, 19.1 mmol, 13%) を無色油状物として、**22d** (21.6 g, 88.8 mmol, 59%) を無色固体として得た。

(2S,3S)-3-(tert-butyldimethylsilyloxy)-2-ethylpyrrolidin-5-one (22c): ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.068 (3H, s), 0.070 (3H, s), 0.89 (9H, s), 0.95 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.43-1.76 (2H, m), 2.26 (1H, dd, *J* = 16.7, 4.2 Hz), 2.51 (1H, dd, *J* = 16.7, 6.3 Hz), 3.43-3.56 (1H, m), 4.39-4.50 (1H, m), 5.94 (1H, brs).

(3R,2S)-3-(tert-butyldimethylsilyloxy)-2-ethylpyrrolidin-5-one (22d): ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.07 (3H, s), 0.08 (3H, s), 0.96 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.33-1.54 (1H, m), 1.54-1.71 (1H, m), 1.54-1.71 (1H, m), 2.26 (1H, dd, *J* = 16.9, 4.6 Hz), 2.60 (1H, dd, *J* = 16.9, 6.9 Hz), 3.30-3.41 (1H, m), 4.05-4.18 (1H, m), 5.71 (1H, brs).

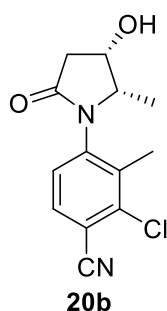
2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-3-hydroxy-2-methyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20a)



22a (1.50 g, 6.54 mmol)、4-ブロモ-2-クロロベンゾニトリル (1.85 g, 8.55 mmol)、炭酸セシウム (3.20 g, 9.82 mmol)、Pd₂(dba)₃ (299 mg, 0.327 mmol)、キサントホス (378mg、0.653mmol) およびジオキサン (30 mL) 混合物を、アルゴン雰囲気下、80°Cで12時間撹拌した。混合物に水を加え、EtOAcで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 20 : 1~4 : 1) を用いて精製し、粗生成物を得た。次いで、粗生成物をエタノール (20 mL) および THF (20 mL) に溶解し、続いて濃塩酸水溶液 (5.45 mL、65.4 mmol) を添加した。室温で2時間撹拌後、混合物を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和し、EtOAcで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 20 : 1~0 : 1) で精製し、EtOAc/ヘキサンから再結晶し、**20a** (0.980 g, 3.91 mmol、60%) を無色結晶として得た。 mp 161–162 °C. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.32 (3H, d, *J* = 6.3 Hz), 2.00 (1H, d, *J* = 4.5 Hz), 2.68 (1H, dd, *J* = 17.4, 5.4 Hz), 2.85 (1H, dd, *J* = 17.4, 6.6 Hz), 4.30–4.42 (1H, m), 4.56–4.65 (1H, m), 7.48 (1H, dd, *J* = 8.7, 1.8 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.73 (1H, d, *J* = 1.8 Hz). Anal. Calcd for C₁₂H₁₁ClN₂O₂·0.1H₂O: C, 57.08; H, 4.47; N, 11.10. Found: C, 57.12; H, 4.40; N, 11.07.

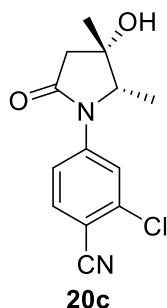
2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-3-hydroxy-2-methyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]-3'-methylbenzonitrile

(20b)



20a について記載した方法と同様の方法で、本化合物を 33% の収率、無色の固体として得た。mp. 172–173 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.12 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.90 (1H, d, $J = 4.2$ Hz), 2.32 (3H, s), 2.59 (1H, dd, $J = 17.4, 2.1$ Hz), 2.87 (1H, dd, $J = 17.4, 5.7$ Hz), 4.10–4.30 (1H, br), 4.50–4.60 (1H, m), 7.00–7.20 (1H, m), 7.56 (1H, d, $J = 8.1$ Hz). Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2 \cdot 0.2\text{H}_2\text{O}$: C, 58.19; H, 5.03; N, 10.44. Found: C, 58.24; H, 4.90; N, 10.44.

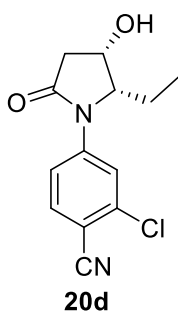
2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-3-hydroxy-2,3-dimethyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20c)



試験管に、4-ブロモ-2-クロロベンゾニトリル (615 mg、2.73 mmol)、**22b** (423 mg、3.27 mmol)、キサントホス (241 mg、409 μmol)、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ (125 mg、136 μmol)、炭酸セシウム (1.31 g、3.82 mmol) および 1,4-ジオキサン (3 mL) を室温で添加した。アルゴンで 3 回置換した後、マイクロ波照射条件下、120°C で 5 時間攪拌した。反応混合物を短いシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) に通した後。濾液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 9 : 1~2 : 3)、次いで NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 7 : 3~1 : 4) で精製

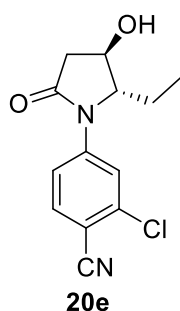
し、**20c** (624 mg、2.34 mmol、86%) を淡黄色粉末として得た。さらに、EtOAc/n-ヘキサンから再結晶し、**20c** (431 mg、1.64 mmol、60%) を白色粉末として得た。mp 93–99 °C. $[\alpha]_D = -27.3^\circ$ (c 0.500, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.28 (3H, d, J = 6.4 Hz), 1.52 (3H, s), 2.01 (1H, s), 2.63 (1H, d, J = 17.0 Hz), 2.79 (1H, d, J = 17.0 Hz), 4.07 (1H, q, J = 6.4 Hz), 7.46 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.67 (1H, d, J = 8.7 Hz), 7.70 (1H, s); IR (KBr) 3410, 2977, 2934, 2880, 2230, 1695, 1596, 1549, 1489, 1409, 1362, 1316, 1268, 1237, 1205, 1179, 1123, 1082, 1050, 1037, 973, 947, 913 cm⁻¹. MS (m/z): 265 ($M + H$)⁺. Anal. Calcd for C₁₃H₁₃N₂O₂Cl: C, 58.99; H, 4.95; N, 10.58. Found: C, 59.07; H, 4.89; N, 10.56.

2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-2-ethyl-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20d)



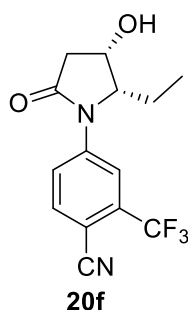
20a について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 18%、無色固体として得た。mp 138–140 °C. $[\alpha]_D = -38.4^\circ$ (c 0.505, CHCl₃). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.02 (3H, t, J = 7.3 Hz), 1.69–1.82 (3H, m), 2.67 (1H, dd, J = 16.8, 3.9 Hz), 2.85 (1H, dd, J = 16.8, 6.9 Hz), 4.06–4.18 (1H, m), 4.62–4.73 (1H, m), 7.40 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.59–7.72 (2H, m). Anal. Calcd for C₁₃H₁₃ClN₂O₂: C, 58.99; H, 4.95; N, 10.50. Found: C, 58.97; H, 4.80; N, 10.44.

2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*R*)-2-ethyl-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20e)



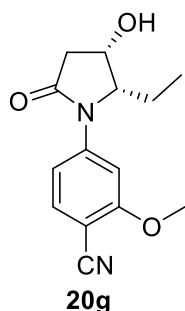
20a について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 87%、無色固体として得た。 mp 118–120 °C. $[\alpha]_D = -37.5^\circ$ (c 1.015, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.00 (3H, t, $J = 7.5\text{Hz}$), 1.41–1.59 (1H, m), 1.69–1.85 (1H, m), 1.97 (1H, br s), 2.55 (1H, dd, $J = 18.0, 1.2\text{Hz}$), 3.01 (1H, dd, $J = 18.0, 5.9\text{Hz}$), 4.08 (1H, dd, $J = 9.3, 3.0\text{Hz}$), 4.32–4.40 (1H, m), 7.59 (1H, dd, $J = 8.7, 2.1\text{Hz}$), 7.66 (1H, d, $J = 8.7\text{Hz}$), 7.91 (1H, d, $J = 2.1\text{Hz}$). Anal. Calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C, 58.99; H, 4.95; N, 10.58. Found: C, 59.01; H, 4.90; N, 10.75.

4'-[(2S,3S)-2-Ethyl-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-yl]-2'-(trifluoromethyl)benzonitrile (20f)



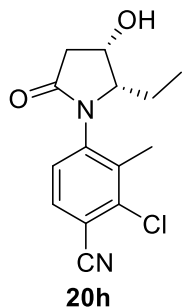
20a について記載した方法と同様の方法を用いて、300 mg (1.23 mmol) の **22c** を用いて本化合物 (115 mg, 0.386 mmol) を 31%の収率で、無色固体として得た。 mp 110–112 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.03 (3H, t, $J = 7.5\text{ Hz}$), 1.71–1.84 (3H, m), 2.64–2.75 (1H, m), 2.81–2.92 (1H, m), 4.14–4.24 (1H, m), 4.66–4.74 (1H, m), 7.70–7.75 (1H, m), 7.83–7.87 (2H, m). Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$: C, 56.38; H, 4.39; N, 9.39. Found: C, 56.42; H, 4.40; N, 9.44.

4'-[(2*S*,3*S*)-2-Ethyl-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-yl]-2'-methoxybenzonitrile (20g)



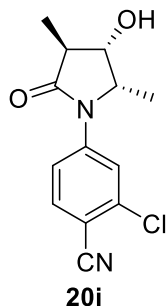
20a について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率 36%、無色の固体として得た。mp 158–160 °C. $[\alpha]_D = -30.0^\circ$ (c 0.505, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.01 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.68–1.82 (3H, m), 2.62–2.70 (1H, m), 2.81–2.90 (1H, m), 3.94 (3H, s), 4.08–4.17 (1H, m), 4.62–4.72 (1H, m), 6.80 (1H, dd, $J = 8.3, 1.9$ Hz), 7.31 (1H, d, $J = 1.7$ Hz), 7.55 (1H, d, $J = 8.3$ Hz). Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 64.60; H, 6.20; N, 10.76. Found: C, 64.63; H, 6.28; N, 10.79.

2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-2-ethyl-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-yl]-3'-methylbenzonitrile (20h)



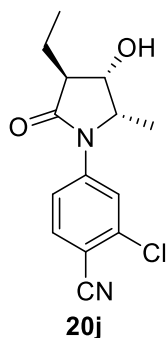
20a について記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を 6%の収率、無色の固体として得た。mp 142–146 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 0.94 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.29–1.50 (1H, m), 1.55–1.77 (1H, m), 1.72 (1H, br s), 2.32 (3H, br s), 2.58 (1H, d, $J = 17.4$ Hz), 2.85 (1H, dd, $J = 17.4, 5.3$ Hz), 3.84–4.05 (1H, m), 4.57–4.68 (1H, m), 6.99–7.17 (1H, m), 7.56 (1H, d, $J = 8.3$ Hz). Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2 \cdot 0.2\text{H}_2\text{O}$: C, 59.56; H, 5.50; N, 9.92. Found: C, 59.31; H, 5.41; N, 9.69.

2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*,4*S*)-3-hydroxy-2,4-dimethyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20i)



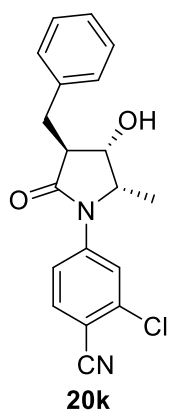
ジイソプロピルアミン (0.150 mL、1.07 mmol) の THF (7 mL) 溶液に、1.6M *n*-ブチルリチウムヘキサン溶液 (0.648 mL、1.04 mmol) を窒素雰囲気下、-78°Cで滴下した。滴下終了後、混合物を-78°Cで1時間攪拌した。続いて **20a** (100 mg、0.399 mmol) の THF (2.5 mL) 溶液を滴下し、さらに-78°Cで30分間攪拌した。ヨウ化メチル (0.124 mL、1.99 mmol) を-78°Cで滴下した後、30分間かけて-10°Cにした。この混合物に酢酸 (1.0 mL) を加えて反応を停止させ、得られた混合物を室温に戻した。水を加えた後、混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 10 : 1~1 : 3) を用いて精製して、**20i** を無色固体 (44.0 mg、0.166 mmol、42%) として得た。mp. 148–150 °C. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.30–1.36 (6H, m), 1.92 (1H, br s), 2.63–2.76 (1H, m), 4.11–4.25 (1H, m), 4.29–4.43 (1H, m), 7.61–7.67 (2H, m), 7.95 (1H, t, *J* = 1.2 Hz). Anal. Calcd for C₁₃H₁₃ClN₂O₂: C, 58.99; H, 4.95; N, 10.58. Found: C, 59.25; H, 4.95; N, 10.41.

2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*,4*S*)-4-ethyl-3-hydroxy-2-methyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20j)



ジイソプロピルアミン (0.15 mL、1.07 mmol) の THF (8 mL) 溶液を -78°C に冷却し、*n*-ブチルリチウムヘキサン溶液 (0.650 mL、1.04 mmol) を滴下した。滴下終了後、混合物を -78°C で 1 時間攪拌した。続いて **20a** (100 mg、0.399 mmol) の THF (2.0 mL) 溶液を滴加し、混合物を -78°C でさらに 1 時間攪拌した。 -78°C でヨードエタン (0.15 mL、1.88 mmol) を滴下し、さらに $-78^{\circ}\text{C}\sim-30^{\circ}\text{C}$ で 1 時間攪拌した。酢酸 (1.0 mL) を加えて反応を停止させ、得られた混合物を室温まで温めた。水を加え、混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 20 : 1~1 : 4) により精製し、**20j** を無色固体として得た (6.70 mg、0.0215 mmol、5.4%)。 mp. $109\sim110^{\circ}\text{C}$. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.10 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.32 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 1.61–1.80 (1H, m), 1.81–1.98 (2H, m), 2.53–2.66 (1H, m), 4.26–4.42 (2H, m), 7.56–7.70 (2H, m), 7.93 (1H, d, $J = 1.5$ Hz). MS (m/z): 279 ($\text{M} + \text{H}$) $^{+}$.

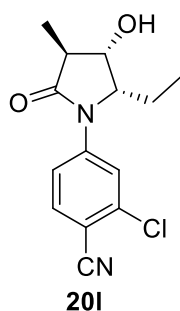
4'-[(2*S*,3*S*,4*S*)-4-Benzyl-3-hydroxy-2-methyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]-2'-chlorobenzonitrile
(20k)



20i について記載したものと同様の方法を用いて、本化合物を収率 30%、無色固体として得た。mp. 99–101 °C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.25 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.48 (1H, d, $J = 4.2$ Hz), 2.58–3.04 (2H, m), 3.25–3.36 (1H, m), 4.11–4.24 (1H, m), 4.25–4.36 (1H, m), 7.21–7.40 (5H, m), 7.51–7.61 (1H, m), 7.61–7.68 (1H, m), 7.88 (1H, d, $J = 2.1$ Hz). Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C, 66.96; H, 5.03; N, 8.22. Found: C, 66.91; H, 5.09; N, 8.34.

2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*,4*S*)-2-ethyl-3-hydroxy-4-methyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile

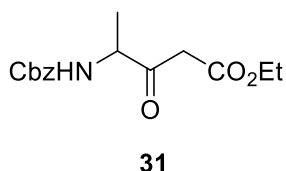
(20l)



ジイソプロピルアミン (0.694 mL、4.95 mmol) の THF (18 mL) 溶液を -78°C に冷却し、1.6M *n*-ブチルリチウムヘキサン溶液 (2.95 mL、4.72 mmol) を滴下した。滴下終了後、混合物を -78°C で 1 時間攪拌した。続いて **20d** (500 mg、1.89 mmol) の THF (4 mL) 溶液を滴下し、さらに -78°C で 1 時間攪拌した。 -78°C でヨードメタン (0.590 mL、9.48 mmol) を滴下し、 $-78^\circ\text{C} \sim 0^\circ\text{C}$ で 1.5 時間攪拌した。混合物に水を加えた後、EtOAc で抽出した。

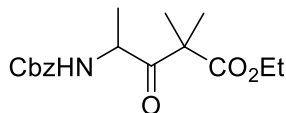
有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 10 : 1~1 : 3) を用いて精製し、**20I** を無色固体として得た (152 mg、0.545 mmol、29%)。mp. 124–129 °C. $[\alpha]_D = -25.6^\circ$ (c 0.160, CHCl₃). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.00 (3H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.30 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.60–1.80 (1H, m), 1.80–1.99 (1H, m), 2.34 (1H, br s), 2.65–2.81 (1H, m), 4.08–4.31 (2H, m), 7.54 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.65 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.86 (1H, s). Anal. Calcd for C₁₄H₁₅ClN₂O₂: C, 60.33; H, 5.42; N, 10.05. Found: C, 60.19; H, 5.40; N, 9.94.

Ethyl 4-{[(benzyloxy)carbonyl]amino}-3-oxopentanoate (**31**)



ジイソプロピルアミン (18.8 mL、134 mmol) の THF (330 mL) 溶液に、1.6M n-ブチルリチウムヘキサン溶液 (84.0 mL、134 mmol) を -78°C で滴下した。-78°C で 1 時間攪拌した後、EtOAc (13.1 mL、316 mmol) を -78°C で滴下した。混合物を -78°C で 1 時間攪拌した後、N-[(ベンジルオキシ)カルボニル]アラニン (**30**) (10.0 g、44.8 mmol) およびカルボニルジイミダゾール (8.72 g、53.8 mmol) の THF (100 mL) 溶液を -78°C で混合物に滴下した。混合物を -78°C で 1 時間攪拌した後、酢酸 (25 mL) を加えて反応を停止させ、室温に戻した。混合物に水を加え、EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 1 : 0~2 : 1) で精製し、**31** (6.11 g、20.8 mmol、46%) を無色油状物として得た。 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.25–1.29 (3H, m), 1.37–1.43 (3H, m), 3.50–3.62 (2H, m), 4.16–4.23 (2H, m), 4.40–4.60 (1H, m), 5.11 (2H, s), 5.30–5.50 (1H, m), 7.32–7.38 (5H, m).

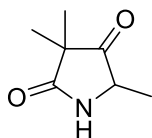
Ethyl 4-[[[(benzyloxy)carbonyl]amino]-2,2-dimethyl-3-oxopentanoate (32)



32

31 (6.00 g, 20.5 mmol)、ヨードメタン (3.82 mL, 61.4 mmol) および炭酸カリウム (5.65 g, 40.9 mmol)、及びアセトン (150 mL) の混合物を一晩還流した。室温に冷却後、混合物に水を加え、EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン: EtOAc = 50 : 1~1 : 1) で精製して **32** (5.56 g, 17.3 mmol, 85%) を無色油状物として得た。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.22 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 1.31 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.41 (3H, s), 1.43 (3H, s), 4.06–4.22 (2H, m), 4.74 (1H, dd, *J* = 8.5, 7.2 Hz), 5.02–5.17 (2H, m), 5.23–5.37 (1H, m), 7.28–7.46 (5H, m).

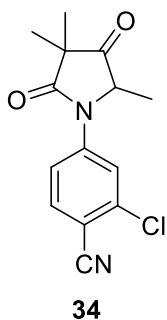
3,3,5-Trimethylpyrrolidine-2,4-dione (33)



33

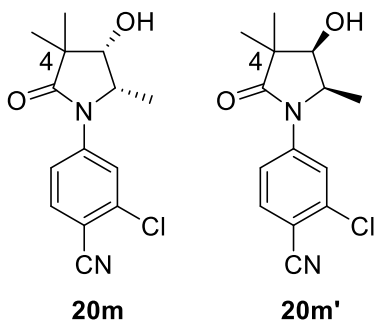
32 (5.56 g, 17.3 mmol) のメタノール (100 mL) 溶液に 10% Pd/C (50% 含水, 2.00 g) を加え、混合物を水素雰囲気下、室温で 18 時間攪拌した。不溶物をセライトパッドで濾去し、濾液を減圧濃縮した。得られた固体をヘキサンで洗浄して **33** (2.13 g, 15.1 mmol, 87%) を無色固体として得た。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.26 (3H, s), 1.27 (3H, s), 1.40 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 4.08 (1H, q, *J* = 6.9 Hz), 6.07 (1H, br s).

2-Chloro-4-(3,3,5-trimethyl-2,4-dioxopyrrolidin-1-yl)benzonitrile (34)



33 (450 mg, 2.48 mmol)、4-ブromo-2-クロロベンゾニトリル (828 mg, 3.83 mmol)、炭酸セシウム (1.56 g, 4.78 mmol)、Pd₂(dba)₃ (292 mg, 0.319 mmol)、キサントホス (553 mg, 0.956 mmol) およびジオキサン (15 mL) 混合物を、アルゴン雰囲気下、80°Cで12時間攪拌した。混合物に水を加え、EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 20 : 1~4 : 1) を用いて精製し、**34** (517 mg, 1.70 mmol, 53%) を無色固体として得た。 mp. 158–160 °C. ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.35 (3H, s), 1.40 (3H, s), 1.46 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 4.61 (1H, q, *J* = 6.9 Hz), 7.55 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.1 Hz), 7.72 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.87 (1H, d, *J* = 2.1 Hz). Anal. Calcd for C₁₄H₁₃ClN₂O₂: C, 60.77; H, 4.74; N, 10.12. Found: C, 60.96; H, 4.60; N, 10.09.

2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-3-hydroxy-2,4,4-trimethyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20m)
and 2'-Chloro-4'-[(2*R*,3*R*)-3-hydroxy-2,4,4-trimethyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20m')



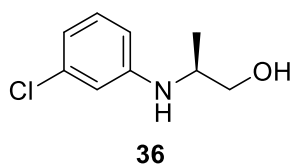
34 (400 mg, 1.45 mmol) の THF (10 mL) 溶液に、窒素雰囲気下、1.0M L-セレクトラ

イド THF 溶液 (2.17 mL、2.17 mmol) を -78°C で加えた。 -78°C で 0.5 時間攪拌した後、混合物に水を加え、EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 20 : 1~1 : 1) で精製し、EtOAc/n-ヘキサンから再結晶してラセミ体 (**20m** および **20m'**、283 mg、1.02 mmol、70%) を無色固体として得た。HPLC を用いてラセミ体 (44.0 mg、0.158 mmol) を分割し、光学活性な **20m** (20.0 mg、71.8 μmol 、45%、99.9%ee) および **20m'** (22.0 mg、78.9 μmol 、49%、99.5%ee)。[Column: CHIRALPAK AD (50 mmID \times 500 mmL); column temperature, 30°C ; mobile phase, hexane:EtOH = 9:1; flow rate, 80 mL/min; UV detection at 220 nm].

compound **20m**: mp $165\text{--}167^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}} = -15.3^{\circ}$ (c 0.515, CHCl_3). $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.23 (3H, s), 1.31 (3H, s), 1.32 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.81 (1H, br s), 4.06–4.16 (1H, m), 4.33–4.48 (1H, m), 7.39–7.50 (1H, m), 7.61–7.73 (2H, m). Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C, 60.33; H, 5.42; N, 10.05. Found: C, 60.31; H, 5.72; N, 9.88.

compound **20m'**: mp $162\text{--}164^{\circ}\text{C}$. $[\alpha]_{\text{D}} = +21.7^{\circ}$ (c 0.655, CHCl_3). Anal. Calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$: C, 60.33; H, 5.42; N, 10.05. Found: C, 60.54; H, 5.63; N, 9.80.

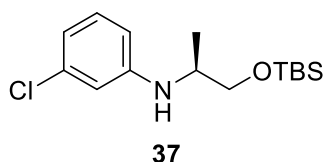
(S)-2-((3-Chlorophenyl)amino)propan-1-ol (**36**)



フラスコに K_3PO_4 (66.4 g、297 mmol)、CuI (1.42 g、7.43 mmol)、(S)-2-アミノプロパン-1-オール (**35**) (11.7 g、149 mmol)、1-クロロ-3-ヨードベンゼン (36.1 g、149 mmol)、エチレングリコール (16.7 mL、297 mmol)、および i-PrOH (155 mL) を室温で添加した。このフラスコをアルゴンで置換した後、 80°C で 1 日攪拌した。反応液に水 (500 mL)

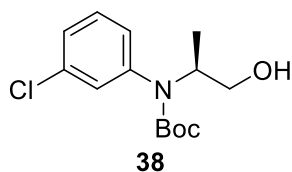
を室温で加えた。得られた混合物をジエチルエーテルで2回抽出した。合わせた有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-EtOAc) を用いて精製し、**36** (26.9 g, 145 mmol, 97%) を無色油状物として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.21 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.78 (1H, brs), 3.47–3.68 (3H, m), 3.72 (1H, brd, *J* = 10.0 Hz), 6.51 (1H, ddd, *J* = 8.1, 2.3, 0.8 Hz), 6.63 (1H, dd, *J* = 2.3, 2.1 Hz), 6.68 (1H, ddd, *J* = 7.9, 2.1, 0.8 Hz), 7.07 (1H, dd, *J* = 8.1, 7.9 Hz). MS (*m/z*): 186 (*M* + H)⁺, 188 (*M* + 2 + H)⁺.

(*S*)-*N*-[1-{(tert-Butyldimethylsilyl)oxy}propan-2-yl]-3-chloroaniline (37**)**



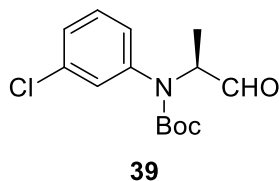
36 (26.9 g, 145 mmol) の DMF (80 mL) 溶液に、室温でイミダゾール (12.8 g, 188 mmol) および TBSCl (29.0 g, 188 mmol) を加えた。50℃で14時間攪拌した後、1M HCl 水溶液 (300 mL, 300 mmol) を室温で加えて反応を停止させた。得られた混合物を EtOAc で抽出した。有機層を 1M HCl 水溶液、水および飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 1 : 0~19 : 1) を用いて精製して **37** (42.2 g, 141 mmol, 97%) を無色油状物として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.04 (3H, s), 0.05 (3H, s), 0.90 (9H, s), 1.19 (3H, d, *J* = 6.2 Hz), 3.46–3.57 (1H, m), 3.61 (2H, d, *J* = 4.2 Hz), 3.90 (1H, d, *J* = 7.4 Hz), 6.46 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.58 (1H, s), 6.63 (1H, d, *J* = 7.9 Hz), 7.05 (1H, dd, *J* = 8.1, 7.9 Hz). MS (*m/z*): 300 (*M* + H)⁺, 302 (*M* + 2 + H)⁺.

(*S*)-tert-Butyl (3-chlorophenyl)(1-hydroxypropan-2-yl)carbamate (38**)**



37 (42.2 g, 141 mmol) の THF (300 mL) 溶液に、 -78°C で 1.6M *n*-ブチルリチウム *n*-ヘキサン溶液 (106 mL, 169 mmol) を添加した。 -78°C で 0.5 時間攪拌した後、 Boc_2O (39.9 g, 183 mmol) の THF (100 mL) 溶液を混合物に滴下した。得られた混合物を窒素雰囲気下、 -78°C で 0.5 時間攪拌した。次いで、反応混合物を自然に室温に戻し、窒素雰囲気下で 6 時間攪拌したのち、飽和塩化アンモニウム水溶液 (300 mL) を加えた。得られた混合物を EtOAc で抽出した。有機層を水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮して粗生成物を得た。この粗生成物を THF (400 mL) に溶かした後、1.0M TBAF THF 溶液 (183 mL, 183 mmol) を室温で加えた。窒素雰囲気下、室温で 20 時間攪拌した後、反応液に水 (300 mL) を加えた。得られた混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : EtOAc = 1 : 0~9 : 1) を用いて精製し、**38** (25.2 g, 73.3 mmol, 62%) を黄色の油状物として得た。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ 1.08 (3H, d, $J = 7.2$ Hz), 1.37 (9H, s), 2.42 (1H, br s), 3.46–3.59 (1H, m), 3.62–3.74 (1H, m), 4.29–4.45 (1H, m), 7.04–7.08 (1H, m), 7.16–7.19 (1H, m), 7.26–7.30 (2H, m).

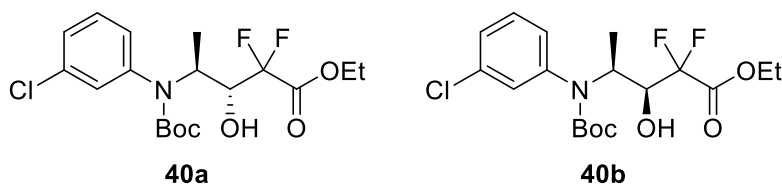
(S)-tert-Butyl (3-chlorophenyl)(1-oxopropan-2-yl)carbamate (39)



塩化オキサリル (318 mg, 2.45 mmol) のジクロロメタン (6 mL) 溶液に、 -65°C で DMSO (258 mg, 3.27 mmol) のジクロロメタン (6 mL) 溶液を添加した。得られた混合物を窒素雰囲気下、 -65°C ~ -55°C で 10 分間攪拌した。次いで、**38** (500 mg, 1.64 mmol) の

ジクロロメタン (8 mL) 溶液を混合物に加え、混合物を窒素雰囲気下、 -65°C ～ -55°C で 10 分間攪拌した。Et₃N (0.93 mL、6.54 mmol) を混合物に添加した。 -65°C ～ -55°C で 30 分間、窒素雰囲気下で攪拌した後、 -65°C ～ -55°C で水 (30 mL) を加えた。得られた混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧下で濃縮し **39** (480 mg、1.59 mmol、96%) を淡黄色の油状物として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.38–1.44 (3H, m), 1.42 (9H, s), 4.09–4.20 (1H, m), 7.09–7.16 (1H, m), 7.22–7.34 (3H, m), 9.75 (1H, s).

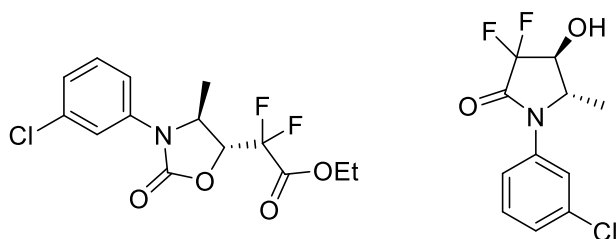
(3*R*,4*S*)-Ethyl 4-{{*tert*-butoxycarbonyl}(3-chlorophenyl)amino}-2,2-difluoro-3-hydroxypentanoate (40a) and (3*S*,4*S*)-ethyl 4-{{*tert*-butoxycarbonyl}(3-chlorophenyl)amino}-2,2-difluoro-3-hydroxypentanoate (40b)



Zn (13.6 g、206 mmol) の THF (25 mL) 懸濁液に、**39** (19.5 g、68.7 mmol)、エチル 2-ブロモ-2,2-ジフルオロアセテート (41.3 g、199 mmol) 及び THF (110 mL) の混合物に室温で加えた。窒素雰囲気下で 1 時間還流した後、 0°C で KHSO₄ 水溶液 (42.1 g、300 mmol、300 mL) を加えて反応を停止させた。得られた混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン–EtOAc) を用いて精製して、**40a** および **40b** (16.2 g、39.6 mmol、58%) の混合物を得た。この混合物をさらに精製することなく次の反応に使用した。

Ethyl 2-{{(4*S*,5*R*)-3-(3-chlorophenyl)-4-methyl-2-oxooxazolidin-5-yl}-2,2-difluoroacetate

(41) and (4*S*,5*S*)-1-(3-chlorophenyl)-3,3-difluoro-4-hydroxy-5-methylpyrrolidin-2-one (42)

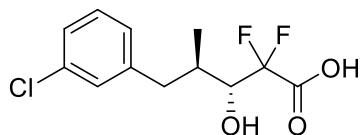


41

42

40a, **40b** (16.2g, 39.6mmol) と 4 M HCl hexane 溶液 (100 mL、400 mmol) の混合物を、室温で 2 時間攪拌した。次いで、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣を THF (275 mL) に溶解した。この混合物に DIEA (21.3 mL、119 mmol) を室温で加えた。12 時間還流した後、混合物に水 (200 mL) を室温で加えた。得られた混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-EtOAc) を用いて精製し、**41** (8.10 g、26.1 mmol、**39** から 38%) および **42** (3.76g、14.4mmol、**39** から 21%) を得た。**41**: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.37 (3H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.46 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.39 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 4.60–4.68 (2H, m), 7.18–7.24 (1H, m), 7.33–7.35 (2H, m), 7.48–7.49 (1H, m). **42**: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.37 (3H, dd, $J = 6.4, 1.3$ Hz), 2.47 (1H, brs), 4.02–4.19 (2H, m), 7.26–7.31 (1H, m), 7.33–7.43 (2H, m), 7.47–7.53 (1H, m).

(4*R*,5*S*)-1-(3-Chlorophenyl)-3,3-difluoro-4-hydroxy-5-methylpyrrolidin-2-one (43)

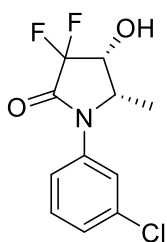


43

41 (5.37 g、15.9 mmol) の EtOH (40 mL) 溶液に、室温で 8 M NaOH 水溶液 (6.95 mL、

55.7 mmol) を添加した。80℃で 1.5 時間撹拌した後、室温で 6 M HCl 水溶液 (9.30 mL、55.7 mmol) を加えて中和した。次いで、混合物を減圧濃縮した。残渣を MeOH (150 mL) に溶解した。この混合物を 4 時間還流した。次いで、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣に水を加えて EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-EtOAc) を用いて精製して **43** (4.04 g、15.4 mmol、97%) を淡黄色粉末として得た。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.31 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 2.63 (1H, brs), 4.34–4.61 (2H, m), 7.26–7.33 (1H, m), 7.34–7.43 (2H, m), 7.50 (1H, s).

(4*R*,5*S*)-1-(3-Chloro-4-iodophenyl)-3,3-difluoro-4-hydroxy-5-methylpyrrolidin-2-one (44)

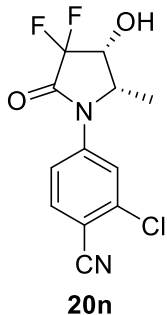


44

43 (3.45 g、13.2 mmol) の AcOH (22 mL) 溶液に、NIS (3.63 g、15.8 mmol) および濃硫酸 (1.43 mL、26.4 mmol) を室温で加えた。室温で 3 時間撹拌した後、水 (50 mL) を加えた。得られた混合物を EtOAc で抽出し、有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 4 : 1 ~ 0 : 1) で精製し、**44** (3.82 g、9.90 mmol、75%) を黄色粉末として得た。 ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.31 (3H, d, $J = 6.4$ Hz), 3.25 (1H, brs), 4.33–4.58 (2H, m), 7.12 (1H, d, $J = 8.7$ Hz), 7.64 (1H, s), 7.90 (1H, d, $J = 8.7$ Hz).

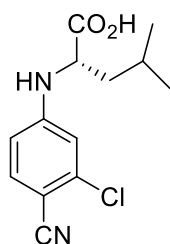
2'-Chloro-4'-{(2*R*,3*S*)-4,4-difluoro-3-hydroxy-2-methyl-5-oxopyrrolidin-1-yl}benzonitrile

(20n)



44 (3.17 g, 8.19 mmol) の NMP (13 mL) 溶液に、室温で CuCN (1.87 g, 20.5 mmol) を加えた。150℃で 2.5 時間、窒素雰囲気下で撹拌した後、水 (100 mL) を室温で反応混合物に添加し、不溶性部分をセライトパッドで濾去した。濾液を EtOAc で抽出し、有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣を NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン-EtOAc)、続いてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 7 : 3~2 : 3) で精製して **20n** (2.02 g, 7.04 mmol, 86%) を白色粉末として得た。さらに、EtOAc/n-ヘキサンからの再結晶により、**20n** (1.48 g, 5.65 mmol, **44** から 63%) を無色プリズム晶として得た。The enantiomeric excess was determined by HPLC analysis (UV: 224 nm, 30 °C); tR1 17.2 min, tR2 18.5 min [Kromasil 5CHI DMB (0.46 cm x 25 cm) (from Eka Chemicals), n-hexane:EtOH = 90:10, 1.0 mL/min] to be 99.8% *ee*.⁴⁰ mp: 149–152 °C (EtOAc/n-hexane). $[\alpha]_D = +3.2^\circ$ (*c* 0.500, CHCl₃). ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.16 (3H, d, *J* = 6.4 Hz), 4.56–4.79 (2H, m), 6.54 (1H, s), 7.87 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.1 Hz), 8.08 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 8.15 (1H, d, *J* = 2.1 Hz). Anal. Calcd for C₁₂H₉N₂O₂ClF₂: C, 50.28; H, 3.16; N, 9.77. Found: C, 50.21; H, 3.13; N, 9.80.

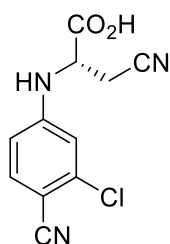
N-(3-Chloro-4-cyanophenyl)-L-leucine (47a)



47a

2-クロロ-3-フルオロベンズニトリル (**46**) (2.00 g、12.9 mmol)、L-ロイシン (**45a**、2.02 g、15.4 mmol) および炭酸セシウム (5.45 g、16.7 mmol) の DMSO (60 mL) 混合物を、90℃で 12 時間攪拌した。混合物を炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回抽出し、水相を合わせた。水相をクエン酸で酸性にし、EtOAc で 2 回抽出した。有機層を合わせ、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮して **47a** (3.43 g、12.9 mmol、100%) を褐色の油状物として得た。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.96 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.01 (3H, d, *J* = 6.2 Hz), 1.65–1.88 (3H, m), 4.06–4.16 (1H, m), 4.50–4.62 (1H, m), 6.50 (1H, dd, *J* = 8.6, 2.4 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 2.5 Hz), 7.42 (1H, d, *J* = 8.5 Hz).

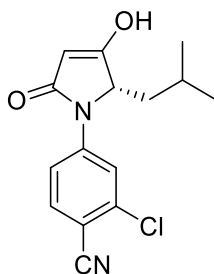
(2S)-2-[(3-Chloro-4-cyanophenyl)amino]-3-cyanopropanoic acid (47b)



47b

47aについて記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率72%、褐色の油状物として調製した。¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.89–3.10 (2H, m), 4.64–4.76 (1H, m), 6.79 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz), 6.98 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 7.42 (1H, d, *J* = 8.9 Hz), 7.60 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 13.46 (1H, brs).

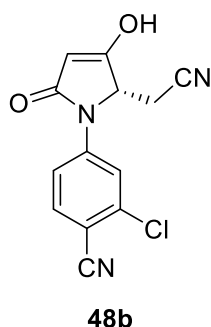
2'-Chloro-4'-[(2*S*)-3-hydroxy-2-(2-methylpropyl)-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl]benzonitrile (48a)



48a

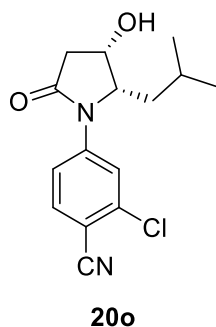
47a (3.40 g, 12.8 mmol)、2,2-ジメチル-1,3-ジオキササン-4,6-ジオン (2.02 g, 14.0 mmol) およびDMAP (2.34 g, 19.1 mmol) のTHF (50 mL) 混合物に、0°CでCDI (2.48 g, 15.3 mmol) を少しずつ加えた。室温で12時間攪拌した後、5%硫酸水素カリウム水溶液を混合物に添加した。混合物をEtOAcで抽出し、5%硫酸水素カリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ減圧濃縮した。残渣をEtOAc (50 mL) で溶解し、1時間還流した。混合物を室温に冷却し、水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。得られた残渣をIPE/EtOAcで洗浄して**48a** (1.18 g, 4.06 mmol, 32%) を無色の固体として得た。 mp. 163–166 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.67 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 0.87 (3H, d, *J* = 6.0 Hz), 1.54–1.75 (3H, m), 5.00 (1H, t, *J* = 4.1 Hz), 5.03 (1H, s), 7.62 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz), 7.93 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 7.99 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 12.42 (1H, br s). Anal. Calcd for C₁₅H₁₅ClN₂O₂: C, 61.97; H, 5.20; N, 9.64. Found: C, 61.93; H, 5.25; N, 9.42.

2'-Chloro-4'-[(2*S*)-2-(cyanomethyl)-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrol-1-yl]benzonitrile (48b)



48aについて記載した方法と同様の方法を用いて、本化合物を収率44%、淡黄色固体として得た。 mp. 179–181 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.01–3.27 (2H, m), 5.15 (1H, s), 5.24 (1H, dd, *J* = 4.9, 3.0 Hz), 7.72 (1H, dd, *J* = 8.7, 2.3 Hz), 7.96 (1H, d, *J* = 8.7 Hz), 8.00 (1H, d, *J* = 2.1 Hz), 12.86 (1H, br s). Anal. Calcd for C₁₃H₈ClN₃O₂·0.1H₂O+0.1EtOAc: C, 56.61; H, 3.19; N, 14.78. Found: C, 56.59; H, 3.18; N, 14.67.

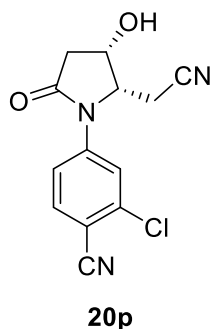
2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-3-hydroxy-2-(2-methylpropyl)-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile
(20o)



48a (550 mg、1.89 mmol) および酢酸 (1.19 mL、20.8 mmol) のアセトニトリル (20 mL) 溶液に、テトラヒドロホウ酸ナトリウム (179 mg、4.73 mmol) を 0°C で少しずつ添加した。混合物を室温で 1 時間攪拌した。次いで、混合物に食塩水を加え、EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 4 : 1~0 : 1) を用いて精

製した。更に THF /ヘキサンから再結晶して、**20o** (342 mg、1.17 mmol、62%) を無色結晶として得た。 mp. 153–154 °C. $[\alpha]_D = -11.5^\circ$ (c 0.500, CHCl₃). ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 0.83 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 0.94 (3H, d, $J = 6.6$ Hz), 1.11–1.22 (1H, m), 1.56–1.84 (2H, m), 2.43 (1H, dd, $J = 16.9, 3.1$ Hz), 2.69–2.80 (1H, m), 4.34–4.45 (2H, m), 5.36 (1H, brs), 7.47 (1H, dd, $J = 8.5, 2.1$ Hz), 7.75 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 8.00 (1H, d, $J = 8.5$ Hz). Anal. Calcd for C₁₅H₁₇ClN₂O₂: C, 61.54; H, 5.85; N, 9.57. Found: C, 61.66; H, 5.83; N, 9.51.

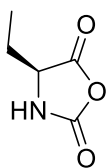
2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-2-(cyanomethyl)-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (20p)



20o について記載したのと同様の方法を用いて、本化合物を収率 59%、無色結晶として得た。 mp. 153–156 °C. ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.55–2.65 (1H, m), 2.74–2.87 (3H, m), 4.53–4.63 (1H, m), 4.76–4.85 (1H, m), 5.91 (1H, s), 7.74 (1H, dd, $J = 8.7, 2.1$ Hz), 7.98–8.04 (2H, m). Anal. Calcd for C₁₃H₁₀ClN₃O₂: C, 56.64; H, 3.66; N, 15.24. Found: C, 56.57; H, 3.63; N, 15.21.

化合物 **20f** のグラムスケール合成。

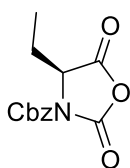
(4*S*)-4-Ethyl-1,3-oxazolidine-2,5-dione (50)



50

(2*S*)-2-アミノブタン酸 (**49**, 12.5 g, 121 mmol) および活性炭 (116 mg) の THF (60 mL) 懸濁液に、トリホスゲン (12.6 g, 42.4 mmol) の THF (60 mL) 溶液を室温に加え、混合物を 50°C で 2 時間撹拌した。同じ実験プロセスを 2 回実施し、その各々において、不溶物をセライトパッドにより濾去した。濾液を合わせ、減圧濃縮した。残渣をヘキサンで洗浄して **50** (27.6 g, 214 mmol, 89%) を固体として得た。 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.06 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.81–2.03 (2H, m), 4.29–4.38 (1H, m), 5.79 (1H, brs).

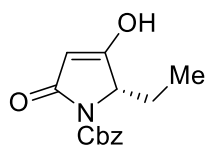
Benzyl (4*S*)-4-ethyl-2,5-dioxo-1,3-oxazolidine-3-carboxylate (51**)**



51

50 (69.6 g, 539 mmol) およびベンジルククロホルレート (101 g, 593 mmol) の THF (800 mL) 溶液を 0°C に冷却し、N-メチルモルホリン (81.7 g, 808 mmol) を滴下し、混合物を 0°C で 2 時間撹拌した。反応混合物に 0°C で 4M HCl EtOAc (86.9 mL, 348 mmol) 溶液を滴下し、沈殿したモルホリン塩酸塩をセライトにより濾去した。濾液を減圧下で濃縮して、**51** (91.6 g, 348 mmol, 65%) を淡黄色油状物として得た。 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.95 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.75–2.35 (2H, m), 4.74 (1H, dd, *J* = 6.0, 3.2 Hz), 5.27–5.44 (2H, m), 7.28–7.49 (5H, m).

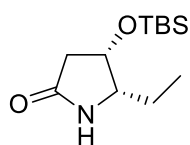
(*S*)-Benzyl 2-ethyl-3-hydroxy-5-oxo-2,5-dihydro-1*H*-pyrrole-1-carboxylate (52**)**



52

51 (91.6 g, 348 mmol) およびトリエチルアミン (58.3 mL, 418 mol) の THF (1 L) 混合物に、0°Cでメルドラム酸 (52.6 g, 365 mmol) を少しずつ加え、混合物を 0°Cで 1 時間撹拌した。5%硫酸水素カリウム水溶液を添加した後、混合物を EtOAc で抽出した。有機層を 5%硫酸水素カリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣を EtOAc (800 mL) に溶解し、混合物を 1 時間還流した。5%炭酸水素ナトリウム水溶液 (800 mL) を添加した後、水層を分離し、クエン酸一水和物で酸性化した。混合物を EtOAc で抽出し、有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮して **52** (75.3g, 288mmol, 83%) を無色の固体として得た。¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.88 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.94–2.09 (2H, m), 3.17–3.22 (2H, m), 4.43–4.51 (1H, m), 5.26–5.41 (2H, m), 7.31–7.48 (5H, m).

(2*S*,3*S*)-3-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-2-ethylpyrrolidin-5-one (22c)

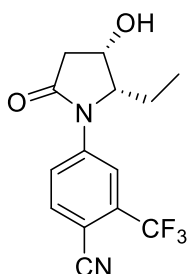


22c

52 (116 g, 444 mmol) および酢酸 (215 mL) のアセトニトリル (1.2 L) 混合物に、窒素雰囲気下、0°Cで水素化ホウ素ナトリウム (30.9 g, 818 mmol) を少しずつ加え、混合物を室温で 18 時間撹拌した。水を加えた後、混合物を EtOAc で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をアセトニトリル (1.2 L) に溶解し、続いて酢酸 (215 mL) および水素化ホウ素ナトリウム (30.9 g, 818 mmol) を 0°Cで加

え、混合物を 0°C で 1 時間攪拌した。混合物に水を加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で塩基性にし、EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣を NH カラムクロマトグラフィー (EtOAc) で精製して、(2*S*,3*S*) -ベンジル 2-エチル-3-ヒドロキシ-5-オキソピロリジン-1-カルボキシラート (117 g、444 mmol、100%) を無色油状物として得た。 ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.26 (3H, t, J = 7.2 Hz), 1.75–1.94 (2H, m), 1.76–1.82 (1H, m), 2.61 (1H, dd, J = 17.4, 7.9 Hz), 2.74 (1H, dd, J = 17.4, 7.6 Hz), 4.08–4.23 (1H, m), 4.52–4.64 (1H, m), 5.19–5.35 (2H, m), 7.30–7.47 (5H, m). (2*S*,3*S*) -ベンジル 2-エチル-3-ヒドロキシ-5-オキソピロリジン-1-カルボキシラート (117 g、444 mmol)、*tert*-ブチルジメチルシリルクロライド (89.0 g、589 mmol) およびイミダゾール (47.4 g、696 mmol) の DMF (2,500 mL) 溶液を室温で 18 時間攪拌した。水を加えた後、混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和 NH₄Cl 水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥させ、減圧濃縮した。残渣を MeOH (800 mL) に溶解し、10% Pd/C (50% 含水、10.0 g) を添加した。混合物を水素雰囲気下、室温で 6 時間攪拌した。不物をセライトにより濾去し、濾液を減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 50 : 1~1 : 1) を用いて精製して **22c** (48.9 g、201 mmol、45%) を無色油状物として得た。

4'-[(2*S*,3*S*)-2-Ethyl-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-yl]-2'-(trifluoromethyl)benzonitrile (20f**)**



20f

22c (6.00 g、24.7 mmol)、4-ヨード-2- (トリフルオロメチル) ベンゾニトリル (8.42 g、

28.4 mmol)、キサントホス (2.14 g, 3.70 mmol)、Pd₂(dba)₃ (1.13 g, 1.23 mmol) および Cs₂CO₃ (12.1 g, 37.0 mmol) のトルエン (70 mL) 混合物を 80°C で 18 時間撹拌した。混合物に水を加え AcOEt で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 50 : 1~1 : 2) で精製し、4-((2*S*,3*S*)-3-{[*tert*-ブチル (ジメチル) シリル]オキシ}-2-エチル-5-オキソピロリジン-1-イル)-2-(トリフルオロメチル) ベンゾニトリル (7.76 g, 18.8 mmol, 76%) を無色固体として得た。¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 0.14 (3H, s), 0.14 (s, 3H), 0.93 (s, 9H), 0.96 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.77–1.94 (m, 1H), 2.66 (1H, dd, *J* = 17.0, 6.8 Hz), 2.76 (dd, 1H, *J* = 17.0, 7.2 Hz), 4.16–4.26 (m, 1H), 4.66 (q, *J* = 6.9 Hz), 7.81–7.87 (2H, m), 7.94–7.99 (1H, m). 4-((2*S*,3*S*)-3-{[*tert*-ブチル (ジメチル) シリル]オキシ}-2-エチル-5-オキソピロリジン-1-イル)-2-(トリフルオロメチル) ベンゾニトリル (7.76g, 18.8 mmol) の EtOH (30 ml)、THF (60 ml)、6 M HCl (60 ml) の混合物を室温で 18 時間撹拌した。炭酸水素ナトリウム水溶液を加え EtOAc で抽出した。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン : EtOAc = 50 : 1~1 : 4) で精製して **20f** (3.32 g, 11.1 mmol, 59%) を無色固体として得た。さらに、EtOAc/n-ヘキサンからの再結晶により、**20f** (2.36g, 7.91mmol, 42%) を無色の固体として得た。鏡像体過剰率は HPLC 解析により決定した。(UV: 220 nm, 30 °C); tR1 17.9 min, tR2 24.1 min [CHIRALPAK AD-H (0.46 cm x 25 cm) (from DAICEL), *n*-hexane:EtOH = 90:10, 1.0 mL/min] to be >99.9% *ee*.⁴² mp. 111–112 °C. [α]_D = –35.5° (*c* 0.588, CHCl₃). ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.03 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.70–1.86 (3H, m), 2.70 (1H, dd, *J* = 17.4, 4.0 Hz), 2.87 (1H, dd, *J* = 17.4, 6.6 Hz), 4.15–4.24 (1H, m), 4.66–4.75 (1H, m), 7.73 (1H, dd, *J* = 8.5, 2.1 Hz), 7.85 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 7.86 (1H, d, *J* = 2.1 Hz). Anal. Calcd for C₁₄H₁₃F₃N₂O₂: C, 56.38; H, 4.39; N, 9.39. Found: C, 56.41; H, 4.35; N, 9.39.

Biology

AR 結合阻害試験

第二章の実験項と同様の方法で実施した。

AR レポーターアッセイ

第二章の実験項と同様の方法で実施した。

動物

第二章の実験項と同様の動物を使用した。

試薬

第二章の実験項と同様の試薬を使用した。

幼若ラットを用いた Hershberger アッセイ ⁴⁷

4 週齢の雄 CD (SD) IGS ラットを化合物の臓器選択的作用を評価するために使用した。化合物の投与を開始する 5 日前にラットを去勢した。化合物を 1 日 2 回、4 日間経口投与した。同時に 0.5mg/kg/day のテストステロンプロピオネート (TP) を投与した。最終投与の翌日、動物をエーテル麻酔下で心臓から血液を採取して屠殺し、前立腺および肛門挙筋を摘出して秤量した。

成獣ラットを用いた Hershberger アッセイ ⁴⁷

8 週齢の雄 CD (SD) IGS ラットを、化合物の臓器選択性を評価するために使用した。化合物の投与を開始する前日にラットを去勢した。去勢ラットを下記の 8 グループ

に分けた。1) vehicle (0.5%メチルセルロース) +テストステロンプロピオネート (TP) 0.4mg / kg /day、2) **20f** 0.15mg / kg /day +TP 0.4 mg / kg /day、3) **20f** 0.5mg / kg /day+ TP 0.4mg / kg /day、4) **20f** 1.5mg / kg /day +TP 0.4 mg / kg /day、5) **20f** 5 mg / kg /day +TP 0.4 mg / kg /day、6) **20f** 15mg / kg /day +TP 0.4 mg / kg /day、7) vehicle (0.5%メチルセルロース) +TP 1.2 mg / kg /day。vehicle または化合物を 1 日 1 回経口投与した。TP は 1 日 1 回皮下投与した。投与は 7 日間継続した。最終投与の翌日、動物をエーテル麻酔下で腹部大動脈から採血して屠殺し、体液 (両側) を含む腹側と背側前立腺、および肛門挙筋を摘出して秤量した。

性行動惹起試験

第二章の実験項と同様の方法で実施した。

代謝安定性

ヒト、マウス、ラット、イヌおよびサル肝臓ミクロソームは、Xenotech, LLC (Lenexa, KS) から購入した。反応混合物は、50 mmol / L リン酸バッファー (pH7.4)、1 mg タンパク質/mL 肝ミクロソーム、1 μ mol / L 試験化合物および NADPH 生成系から構築した。反応混合物中の NADPH 生成系は、5 mmol / L MgCl₂、5 mmol / L グルコース-6-リン酸、0.5 mmol / L β -NADP +および 1.5 unit / mL のグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼから構築している。反応混合物を、ラットでは 37°C で 15 分間、他の種では 60 分間インキュベートした。反応混合物と同量のアセトニトリルの添加により反応を停止させた。全てのインキュベーションは 2 回行った。インキュベーション前後の試験化合物を、PDA 検出器 (Waters, Milford, MA) を備えた UPLC によって分析した。化合物の消失率から、以下の式で代謝クリアランスを算出した。

代謝クリアランス ($\mu\text{L}/\text{分}/\text{mg}$) = 化合物の消失率/インキュベーション時間 (分) \times ミクロソームタンパク質濃度 ($1\text{mg}/\text{mL}$)。

薬物動態

試験化合物を、摂食状態の実験動物 (雄、 $n=3$; ラット、イヌおよびサル) に $0.1\text{mg}/\text{kg}$ の用量で静脈内投与、または $1\text{mg}/\text{kg}$ の用量で経口投与した。投与後、血液サンプルを特定の時点で収集し、遠心分離して血漿画分を得た。血漿サンプルをアセトニトリルで脱タンパクし、続いて遠心分離し、上清を LC/MS/MS で分析して、試験化合物の血漿濃度を決定した。PK パラメータはモーメント解析法により計算した。

実験に用いたアンドロゲン受容体の分子生物学、タンパク質発現、精製および結晶学情報

各複合体について、野生型ヒトアンドロゲン受容体 (wtAR) のアミノ酸671-919 (Uniprot: P10275; <https://www.uniprot.org/uniprot/P10275>) は、大腸菌において6xHisタグタンパク質として過剰発現させた。wtARタンパク質を、固定化した Ni^{2+} アフィニティークロマトグラフィーで精製し、続いてSuperdex 200カラム (GE Healthcare) でサイズ排除し、次に25 mM HEPES pH7.2、150 mM LiSO_4 、10 mM DTT、10%グリセロール、0.1% β -オクチルグルコシド、および100 μM の阻害化合物からなる緩衝液中で10~20 mg / ml に濃縮した。注目すべきこととして、発現から最後の濃縮まで阻害化合物を $>100\mu\text{M}$ の存在下の場合にのみ、wtARと化合物の複合体を順調に調製することができた点があげられる。

データ収集に適した結晶は、 20°C における液滴からの蒸気拡散法によって得られた。 $0.8225\text{ M}\sim 1.0763\text{ M}$ の二塩基性リン酸アンモニウム、 $0.03\text{ M}\sim 0.05\text{ M}$ の二塩基性リン酸カリウム、および $0.03\text{ M}\sim 0.05\text{ M}$ のリン酸一ナトリウム塩含むリザーバーは、50 nl : 50

nlのハンギングドロップ中タンパク質と混合した。凍結保護のため、得られた結晶は20～30%のグリセロールを含む母液に浸漬し、液体窒素中で急速凍結した。記載されたwtAR複合体の結晶は、同様の単位格子寸法を有する斜方晶系空間群 $P2_12_12_1$ および非対称単位中の1分子で成長した。

回折データは、単一の低温保護された結晶から、Lawrence Berkeley National LaboratoryのAdvanced Light Source 5.0.2または5.0.3、いずれかのビームラインで収集した。回折データは、HKL2000ソフトウェアパッケージを使用して処理した⁵³。構造は、CCP4プログラムスイートのMOLREP⁵⁴またはPHASER⁵⁵のいずれかによる分子置換によって決定し、REFMACプログラムで精緻化した⁵⁶。それぞれのモデルのクオリティ向上のため、COOT⁵⁷を使用した数回のモデル構築とリファインメントを行った。結晶構造解析の詳細データはTable S1 (Supplementary data) に示す。

座標および構造因子はProtein Data Bankに保管され、アクセッションコードは5V8Qである (ARと20fの共結晶)。

引用文献と注釈

- 1) Gao, W.; Bohl, C. E.; Dalton, J. T. Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 3352–3370.
- 2) Moodradian, A. D.; Morley, J. E.; Korenman, S. G. Biological Actions of Androgens. *Endocrine Reviews* **1987**, *8*, 1–28.
- 3) Matsumoto, T.; Sakari, M.; Okada, M.; Yokoyama, A.; Takahashi, S.; Kouzmenko, A.; Kato, S. The Androgen Receptor in Health and Disease. *Annu. Rev. Physiol.* **2013**, *75*, 201–224.
- 4) Fang, H.; Tong, W.; Branham, W. S.; Moland, C. L.; Dial, S. L.; Hong, H.; Xie, Q.; Perkins, R.; Owens, W.; Sheehan, D. M. Study of Natural, Synthetic, and Environmental Chemicals for Binding to the Androgen Receptor. *Chem. Res. Toxicol.* **2003**, *16*, 1338–1358.
- 5) Miller, W. L. Molecular Biology of Steroid Hormone Synthesis. *Endocr. Rev.* **1988**, *9*, 295–318.
- 6) Russell, D. W.; Berman, D. M.; Bryant, J. T.; Cala, K. M.; Davis, D. L.; Landrum, C. P.; Prihoda, J. S.; Silver, R. I.; Thigpen, A. E.; Wigley, W. C. The Molecular Genetics of Steroid 5 α -Reductases. *Recent Prog. Horm. Res.* **1994**, *49*, 275–284.
- 7) Roy, A. K.; Chatterjee, B. Androgen Action. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* **1995**, *5*, 157–176.
- 8) Pratt, W. B.; Toft, D. O. Steroid Receptor Interactions with Heat Shock Protein and Immunophilin Chaperones. *Endocr. Rev.* **1997**, *18*, 306–360.
- 9) Ahern, T.; Wu, C. W. New horizons in testosterone and the ageing male. *Age Ageing* **2015**, *44*, 188–195.
- 10) Isidori, A. M.; Greco, E. A.; Aversa, A. Androgen deficiency and hormone-replacement therapy. *BJU Int.* **2005**, *96*, 212–216.

- 11) Narayanan, R.; Mohler, M. L.; Bohl, C. E.; Miller, D. D.; Dalton, J. T. Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development. *Nucl. Recept. Signaling* **2008**, 6. DOI: 10.1621/nrs.06010
- 12) Crawford, J. Clinical results in cachexia therapeutics. *J. Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* **2016**, 19, 199–204.
- 13) Hsieh, M. J.; Yang, T. M.; Tsai, Y. H. Nutritional supplementation in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J. Formosan Medical Association.* DOI: 10.1016/j.jfma.2015.10.008
- 14) Harman, S. M.; Metter, E. J.; Tobin, J. D.; Pearson, J.; Blackman, M. R. Longitudinal Effects of Aging on Serum Total and Free Testosterone Levels in Healthy Men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, 86, 724–731.
- 15) Peluso, I.; Palmery, M. The relationship between body weight and inflammation: Lesson from anti-TNF- α antibody therapy. *Human Immunology.* **2016**, 77, 47–53.
- 16) Udediba, E.; Kaminetsky, J. Phase II drugs currently being investigated for the treatment of hypogonadism. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2014**, 23, 1605–1618.
- 17) Choi, S. M.; Lee, B-M. Comparative safety evaluation of selective androgen receptor modulators and anabolic androgenic steroids. *Expert Opin. Drug Saf.* **2015**, 14, 1773–1785.
- 18) Bhasin, S.; Bremner, W. J. Emerging Issues in Androgen Replacement Therapy *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, 82, 3–8.
- 19) Sun, C.; Robl, J. A.; Wang, T. C.; Huang, Y.; Kuhns, J. E.; Lupisella, J. A.; Beehler, B. C.; Golla, R.; Sleph, P. G.; Seethala, R.; Fura, A.; Krystek, Jr. S. R.; An, Y.; Malley, M. F.; Sack, J. S.; Salvati, M. E.; Grover, G. J.; Ostrowski, J.; Hamann, L. G. Discovery of Potent, Orally-Active, and Muscle-Selective Androgen Receptor Modulators Based on an *N*-Aryl-hydroxybicyclohydantoin Scaffold. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 7596–7599.

- 20) Gelfand, M. M.; Wiita, B. Androgen and estrogen-androgen hormone replacement therapy: a review of the safety literature, 1941 to 1996. *Clin. Ther.* **1997**, *19*, 383–404.
- 21) Mohler, M. L.; Bohl, C. E.; Jones, A.; Coss, C. C.; Narayanan, R.; He, Y.; Hwang, D. J.; Dalton, J. T.; Miller, D. D. Nonsteroidal Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs): Dissociating the Anabolic and Androgenic Activities of the Androgen Receptor for Therapeutic Benefit. *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 3597–3617.
- 22) Zhang, X.; Sui, Z. Deciphering the selective androgen receptor modulators paradigm. *Expert Opin. Drug Discov.* **2013**, *8*, 191–218.
- 23) Haendler, B.; Cleve, A. Recent Developments in antiandrogens and selective androgen receptor modulators. *Moll. Cell Endocrinol.* **2012**, *352*, 79–91.
- 24) Cosman, F.; Lindsay, R. Selective Estrogen Receptor Modulators: Clinical Spectrum. *Endocr. Rev.* **1999**, *20*, 418–434
- 25) Jones, A.; Chen, J.; Hwang, D. J.; Miller, D. D.; Dalton, J. T. Preclinical Characterization of a (*S*)-*N*-(4-Cyano-3-Trifluoromethyl-Phenyl)-3-(3-Fluoro,4-Chlorophenoxy)-2-Hydroxy-2-Methyl-Propanamide: A Selective Androgen Receptor Modulator for Hormonal Male Contraception. *Endocrinology* **2009**, *150*, 385–395.
- 26) Srinath, R.; Dobs, A. Enobosarm (GTx-024, S-22): a potential treatment for cachexia. *Future Oncol.* **2014**, *10*, 187–194.
- 27) Ostrowski, J.; Kuhns, J. E.; Lupisella, J. A.; Manfredi, M. C.; Beehler, B. C.; Krystek, S. R., Jr.; Bi, Y.; Sun, C.; Seethala, R.; Golla, R.; Sleph, P. G.; Fura, A.; An, Y.; Kish, K. F.; Sack, J. S.; Mookhtiar, K. A.; Grover, G. J.; Hamann, L. G. Pharmacological and X-Ray Structural Characterization of a Novel Selective Androgen Receptor Modulator: Potent Hyperanabolic Stimulation of Skeletal Muscle with Hypostimulation of Prostate in Rats. *Endocrinology* **2007**, *148*, 4–12.

- 28) Martinborough, E.; Shen, Y.; Oeveren, A.; Long, Y. O.; Lau, T. L.; Marschke, K. B.; Chang, W. Y.; Lopez, F. J.; Vajda, E. G.; Rix, P. J.; Viveros, O. H.; Negro-Vilar, A.; Zhi, L. Substituted 6-(1-Pyrrolidine)quinolin-2(1*H*)-ones as Novel Selective Androgen Receptor Modulators. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5049–5052.
- 29) Basaria, S.; Collins, L.; Dillon, E. L.; Orwoll, K.; Storer, T. W.; Miciek, R.; Uloor, J.; Zhang, A.; Eder, R.; Zientek, H.; Gordon, G.; Kazmi, S.; Sheffield-Moore, M.; Bhasin, S. The safety, pharmacokinetics, and effects of LGD-4033, a novel nonsteroidal oral, selective androgen receptor modulator, in healthy young men. *J. Gerontol A. Biol. Sci. Med. Sci.* **2013**, *68*, 87–95.
- 30) Turnbull, P.; Cadilla, R.; Shen, Y.; Poole, C.; Stewart, E.; Gampe, R.; Clark, R.; Henke, B.; Russell, A. Discovery of GSK2881078A: A selective androgen receptor modulator (SARM) for the treatment of muscle wasting disorders. Abstracts of Papers, 249th ACS National Meeting & Exposition, Denver, CO, United States, Mar 22-26, 2015; MEDI 247.
- 31) Narayanan, R.; Ahn, S.; Cheney, M. D.; Yepuru, M.; Miller, D. D.; Steiner, M. S.; Dalton, J. T. Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) Negatively Regulate Triple-Negative Breast Cancer Growth and Epithelial: Mesenchymal Stem Cell Signaling. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 7 e103202.
- 32) Nique, F. Hebbe, S.; Triballeau, N.; Peixoto, C.; Lefrançois, J.-M.; Jary, H.; Alvey, L.; Manioc, M.; Housseman, C.; Klaassen, H.; Beeck, K. V.; GuéD.; Namour, F.; Minet, D.; Van der Aar, E.; Feyen, J.; Fletcher, S.; Blanqué, R.; Robin-Jagerschmidt, C.; Deprez, P. Identification of a 4-(Hydroxymethyl)diarylhydantoin as a Selective Androgen Receptor Modulator. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 8236-8247.
- 33) Cozzoli, A.; Capogrosso, R. F.; Sblendorion, V. T.; Dinardo, M. M.; Jagerschmidt, C.; Namour, F.; Camerino, G. M.; Luca, A. D. GLPG0492, a novel selective androgen receptor

- modulator, improves muscle performance in the exercised-mdx mouse model of muscular dystrophy. *Pharm. Res.* **2013**, 72, 9-24.
- 34) Hershberger, L. G.; Shipley, E. G.; Meyer, R. K. Myotrophic Activity of 19-Nortestosterone and Other Steroids Determined by Modified Levator Ani Muscle Method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1953**, 83, 175–180.
- 35) Asano, M.; Hitaka, T.; Imada, T.; Yamada, M.; Megumi, M.; Shinohara, H.; Hara, T.; Yamaoka, M.; Santou, T.; Nakayama, M.; Imai, Y.; Habuka, N.; Yano, J.; Wilson, K.; Fujita, H.; Hasuoka, A. Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs). Part II: Optimization of 4-(pyrrolidin-1-yl)benzonitrile derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 1897-1901.
- 36) Supplementary Table 2 in supporting information (S6)
- 37) The optical purity of compound **5** was confirmed in reference 35.
- 38) Supporting information (S3)
- 39) Supporting information (S4)
- 40) The activity **20m'**; IC₅₀ = 6600 nM, EC₅₀ < 10000 nM.
- 41) Supporting information (S4)
- 42) The analytical condition was depicted in experimental section for **20n**.
- 43) Synthesis of **rac-20n** is depicted in supporting information (S1).
- 44) Supporting information (S3)
- 45) The analytical condition was depicted in experimental section for **20f**.
- 46) Synthesis of **rac-20f** is depicted in supporting information (S2).
- 47) Aikawa, K.; Miyawaki, T.; Hitaka, T.; Imai, Y.; Hara, T.; Miyazaki, J.; Yamaoka, M.; Kusaka, M.; Kanzaki, N.; Tasaka, A.; Shiraish, M.; Yamamoto, S. Synthesis and biological evaluation

of novel selective androgen receptor modulators (SARMs). Part I. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 2568–2578.

48) Supplementary Table 3

49) Saeed, A.; Vaught, G. M.; Gavardinas, K.; Matthews, D.; Green, J. E.; Losada, P. G.; Bullock, H. A.; Calvert, N. A.; Patel, Nita. J.; Sweetana, S. A.; Krishnan, Ve.; Henck, J. W.; Luz, J. G.; Wang, Y.; Jadhav, Prabhakar. 2-Chloro-4-[(1*R*,2*R*)-2-hydroxy-2-methyl-cyclopentyl]amino]-3-methyl-benzonitrile: A Transdermal Selective Androgen Receptor Modulator (SARM) for Muscle Atrophy. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 750–755

50) Ullrich, T.; Sasmal, S.; Boorgu, V.; Pasagadi, S.; Cheera, S.; Rajagopalan, S.; Bhumireddy, A.; Shashikumar, D.; Chelur, S.; Belliappa, C.; Pandit, C.; Krishnamurthy, N.; Mukherjee, S.; Ramanathan, A.; Ghadiyaram, C.; Ramachandra, M.; Santos, P. G.; Lagu, B.; Bock, M. G.; Perrone, M. H.; Weiler, S.; Keller, H. 3-Alkoxy-pyrrolo[1,2-*b*]pyrazolines as selective androgen receptor modulators with idea physiochemical properties for transdermal administration. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 7396–7411.

51) Hikichi, Y.; Yamaoka, M.; Kusaka, M.; Hara, T. Selective androgen receptor modulator activity of a steroidal antiandrogen TSAA-291 and its cofactor recruitment profile. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *765*, 322–331.

52) Meijssing, S. H.; Pufall, M. A.; So, A. Y.; Bates, D. L.; Chen, L.; Yamamoto, K. R. DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity. *Science.* **2009**, *324*, 407–410.

53) Otwinowski, Z.; Minor, W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **1997**, *276*, 307–326.

54) Vagin, A.; Teplyakov, A. MOLREP: an automated program from molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022–1025.

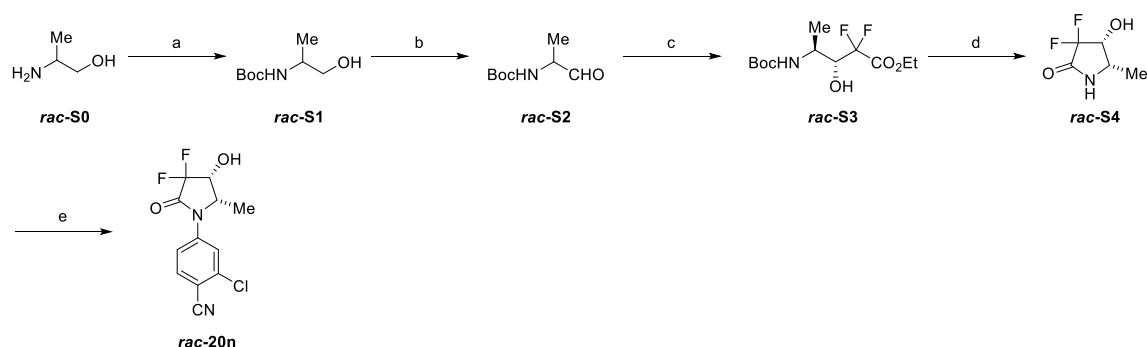
- 55) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **2007**, *40*, 658-674.
- 56) Murshudov, G. N.; Vagin, A. A.; Dodson, E. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *J. Acta Crystallogr., Sect. D* **1997**, *53*, 240-255.
- 57) McRee, D. E. XtalView/Xfit-a versatile program for manipulating atomic coordinates and electron density. *J. Struct. Biol.* **1999**, *125*, 156-165.

サポーターディングインフォメーション

S1	20n の光学純度測定を目的とした <i>rac-20n</i> の合成.....	114
S2	20f の光学純度測定を目的とした <i>rac-20f</i> の合成.....	118
S3	X 線結晶構造解析を用いた、 20d,n,o の相対配置の決定.....	119
S4	NMR 解析 (NOESY) を用いた 20e,i,m の相対配置の決定.....	123
S5	Supplementary Table 1: 20f と AR LBD との共結晶構造解析データ.....	124
S6	Supplementary Table 2 : 代謝安定性.....	127
S7	Supplementary Table 3 : 20c の薬物動態 (CrI:CD(SD) rat, male).....	128
S8	Reference.....	129

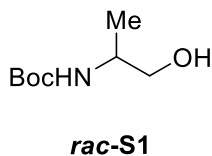
S1 **20n** の光学純度測定を目的とした **rac-20n** の合成

Scheme S1. Synthesis of **rac-20n**.



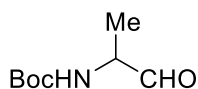
^aReagents and conditions: (a) Boc₂O, 1 M aqueous NaOH, 96%; (b) SO₂•Py (19.7 g, 111 mmol), DMSO, 56%; (c) Br(F)₂CCO₂Et, Zn, THF, reflux, 60%; (d) (1) 4 M HCl in EtOAc; (2) *i*-Pr₂NEt, THF, reflux, 68% for 2 steps; (e) Pd₂(dba)₃, Xantphos, Cs₂CO₃, 1,4-dioxane, 18%.

rac-tert-Butyl (1-hydroxypropan-2-yl)carbamate (*rac*-S1)



2-アミノプロパン-1-オール (**rac-S0**) (3.00 g, 39.1 mmol) の THF (60 mL) 溶液に、1M NaOH 水溶液 (30 mL, 30.0 mmol) および Boc₂O (10.3 g, 47.0 mmol) の THF (20 mL) 溶液を室温で加えた。室温で 14 時間攪拌した後、反応混合物を Et₂O で 2 回抽出した。合わせた有機層を硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧下で濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン–EtOAc) を用いて精製し、**rac-S1** (6.61 g, 37.6 mmol, 96%) を白色粉末として得た。 mp. 45–50 °C. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.15 (3H, d, *J* = 6.8 Hz), 1.45 (9H, s), 3.09 (1H, br s), 3.50 (1H, dd, *J* = 10.9, 6.0 Hz), 3.62 (1H, dd, *J* = 10.9, 3.8 Hz), 3.67–3.83 (1H, m), 4.81 (1H, brd, *J* = 6.6 Hz). Anal. Calcd for C₈H₁₇NO₃: C, 54.84; H, 9.78; N, 7.99. Found: C, 54.83; H, 9.82; N, 7.74.

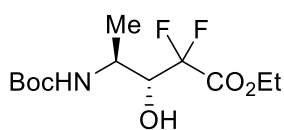
***rac*-tert-Butyl (1-oxopropan-2-yl)carbamate (*rac*-S2)**



***rac*-S2**

rac-tert-ブチル (1-ヒドロキシプロパン-2-イル) カルバメート (***rac*-S1**) (6.50 g, 37.1 mmol) の DMSO (65 mL) 溶液に、SO₂•Py (19.7 g, 111 mmol) の DMSO (65 mL) 溶液を 0°C (氷浴) で滴下した。窒素雰囲気下、0°C で 2 時間攪拌した後、1M クエン酸水溶液 (130 mL) を室温に加えて反応を停止させた。得られた混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 1 : 0~7 : 3) で精製し、***rac*-S2** (3.62 g, 12.2 mmol, 56%) を白色粉末として得た。 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 1.34 (3H, d, *J* = 7.4 Hz), 1.46 (9H, s), 4.16–4.35 (1H, m), 5.12 (1H, br s), 9.56 (1H, br s).

***rac*-(3*R**,4*S**)-tert-Ethyl 4-{{*tert*-butoxycarbonyl}amino}-2,2-difluoro-3-hydroxypentanoate (*rac*-S3)**

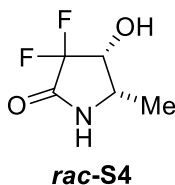


***rac*-S3**

Zn (4.01 g, 60.6 mmol) の THF (8 mL) 懸濁液に、***rac*-S2** (3.50 g, 20.2 mmol)、エチル 2-ブロモ-2,2-ジフルオロアセテート (12.1 g, 58.6 mmol) の THF (35 mL) 溶液を室温に加えた。窒素雰囲気下で 1 時間還流した後、1M 硫酸水素カリウム水溶液 (65 mL) を室温に加え反応を停止させた。得られた混合物を EtOAc で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥し、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) を用いて精製し、***rac*-S3** (3.62 g, 12.2 mmol, 60%)

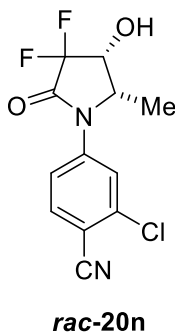
を黄色油状物として得た。これをさらに精製することなく次の反応に用いた。

***rac*-(3*R**,2*S**)-4,4-Difluoro-3-hydroxy-2-methylpyrrolidin-5-one (*rac*-S4)**



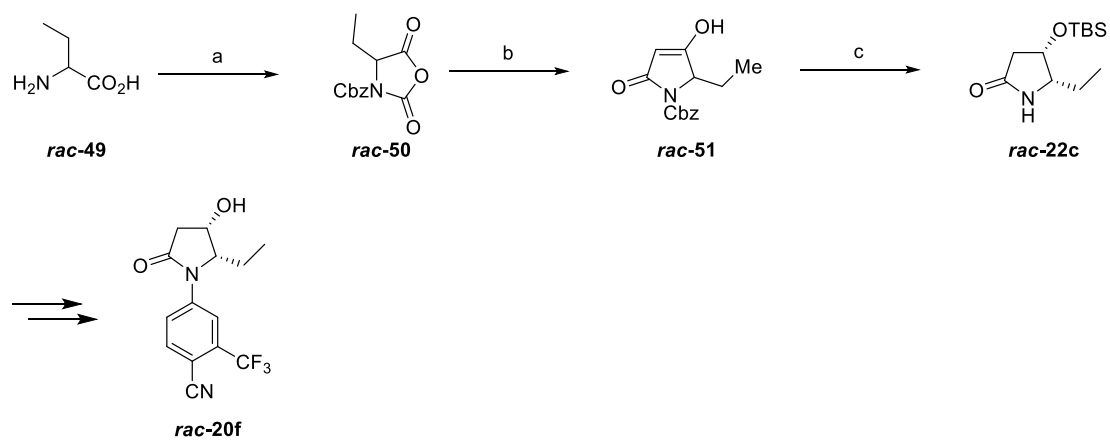
4M HCl EtOAc 溶液 (20 mL、80.0 mmol) と *rac*-S3 (3.62 g、12.2 mmol) の混合物を、室温で 2 時間攪拌した。次いで、混合物を減圧濃縮した。残渣を THF (60 mL) に溶解した。得られた混合物に DIEA (6.30 mL、36.5 mmol) を室温で添加した。還流下で 3 時間攪拌した後、反応混合物を減圧濃縮した。得られた残渣を短いシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) に通した。ろ液を減圧濃縮した。得られた残渣を IPE で洗浄して *rac*-S4 (1.26 g、8.34 mmol、68%) を淡黄色粉末として得た。 mp. 134–138. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.06 (3H, dd, *J* = 6.6, 0.9 Hz), 3.71 (1H, dt, *J* = 13.0, 6.6 Hz), 4.18–4.33 (1H, m), 6.12 (1H, d, *J* = 5.9 Hz), 8.85 (1H, br s). MS (API): *m/z* 152 (*M* + *H*)⁺; Anal. Calcd for C₅H₇NO₂F₂: C, 39.74; H, 4.67; N, 9.27. Found: C, 39.84; H, 4.65; N, 9.14.

***rac*-2-Chloro-4-[(3*R**,2*S**)-4,4-difluoro-3-hydroxy-2-methyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (*rac*-20n)**



試験管に、4-ブロモ-2-クロロベンズニトリル (1.24 g、5.51 mmol)、*rac*-**S4** (1.00 g、6.62 mmol)、キサントホス (488 mg、827 μ mol)、Pd₂(dba)₃ (252 mg、276 μ mol)、Cs₂CO₃ (2.65 g、7.72 mmol) および 1,4-ジオキサン (6 mL) を室温で添加した。得られた試験管を 3 回アルゴン置換した。マイクロ波照射条件下、100°C で 3 時間撹拌した後、反応混合物を短いシリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc) に通した。ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 9 : 1 から 2 : 3) および NH シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ヘキサン : EtOAc = 7 : 3 から 3 : 7) で精製し、続いて EtOAc / n-ヘキサンで再結晶して、*rac*-**20n** (286 mg、1.00 mmol、18%) を淡黄色粉末として得た。キラル HPLC 解析の結果からラセミ体であることを確認した。 (UV: 224 nm, 30 °C); tR1 17.2 min, tR2 18.5 min [Kromasil 5CHI DMB (0.46 cm x 25 cm) (from Eka Chemicals), n-hexane/EtOH = 90:10, 1.0 mL/min]. mp: 136–139 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.16 (3H, d, *J* = 6.2 Hz), 4.51–4.80 (2H, m), 6.54 (1H, s), 7.87 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.08 (1H, d, *J* = 8.5 Hz), 8.15 (1H, s).

S2 **20f** の光学純度測定を目的とした **rac-20f** の合成



rac-49 を出発化合物として使用して、**20f** について記載したものと同様の方法を用いて **rac-20f** を合成した。

rac-20f の NMR と MS のデータは、**20f** と一致した。

Compound **rac-2f**: mp. 94–95 °C. $[\alpha]_D = +1.2^\circ$ (c 0.498, CHCl_3). Anal. Calcd for

$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$: C, 56.38; H, 4.39; N, 9.39. Found: C, 56.46; H, 4.37; N, 9.37.

S3 X 線結晶構造解析を用いた、**20d,n,o** の相対配置の決定

黒鉛単色 Cu-K α 線を用いた Rigaku R-AXIS RAPID-191R 回折計で行った。この構造は、SIR2008^{S2} を用いた直接法で解き、SHELXL-2013^{S3} で F^2 上のフルマトリックス最小二乗法を用いてリファインした。非 H 原子はすべて異方性置換パラメータでリファインした。各化合物の結晶データ（補足的な結晶学的データを含む）は、The Cambridge Crystallographic Data Center (CCDC) から無料で入手できる。

<http://www.ccdc.cam.ac.uk/Community/Requestastructure/Pages/DataRequest.aspx?>.

Crystal data for 20d (CCDC1526941)

C₁₃H₁₃ClN₂O₂, $MW = 264.71$; crystal size, 0.12 x 0.06 x 0.05 mm; colorless, block;

monoclinic, space group $C2$, $a = 33.5164(16)$ Å, $b = 4.6779(3)$ Å, $c = 16.6217(9)$ Å, $\alpha = \gamma$

$= 90^\circ$, $\beta = 103.039(7)^\circ$, $V = 2538.8(2)$ Å³, $Z = 8$, $D_x = 1.385$ g/cm³, $T = 100$ K, $\mu = 2.639$

mm⁻¹, $\lambda = 1.54187$ Å, $R_1 = 0.052$, $wR_2 = 0.104$, Flack Parameter^{S1} = 0.038(6).

Drawing Structure of **20d**

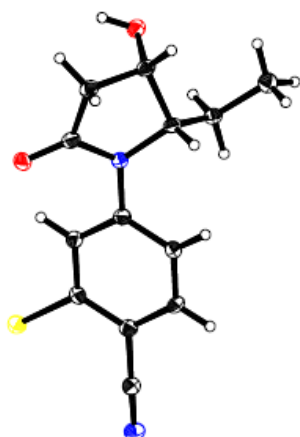


Figure S1. ORTEP of **20d**, thermal ellipsoids are drawn at 30% probability.

Crystal data for 20n (CCDC 1526940)

$\text{C}_{12}\text{H}_9\text{ClF}_2\text{N}_2\text{O}_2$, $MW = 286.67$; crystal size, 0.39 x 0.36 x 0.27 mm; colorless, block;

orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $a = 7.5374(4) \text{ \AA}$, $b = 11.0456(5) \text{ \AA}$, $c =$

$14.0831(8) \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $V = 1172.50(10) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $D_x = 1.624 \text{ g/cm}^3$, $T = 100$

K , $\mu = 3.166 \text{ mm}^{-1}$, $\lambda = 1.54187 \text{ \AA}$, $R_1 = 0.049$, $wR_2 = 0.120$, Flack Parameter^{S1} =

0.006(5).

Drawing Structure of **20n**

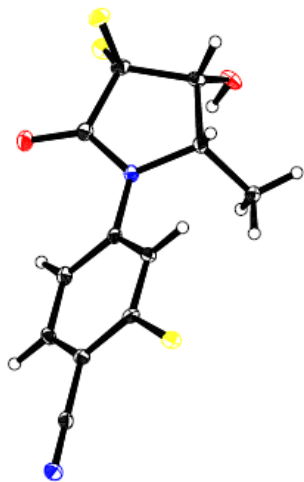


Figure S2. ORTEP of **20n**, thermal ellipsoids are drawn at 30% probability.

Crystal data for 20o (CCDC1526942)

$C_{15}H_{17}ClN_2O_2$, $MW = 292.76$; crystal size, 0.45 x 0.26 x 0.06 mm; colourless, plate;

orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $a = 5.95380(6)$ Å, $b = 10.43270(10)$ Å, $c =$

$24.0656(3)$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, $V = 1494.82(3)$ Å³, $Z = 4$, $D_x = 1.301$ g/cm³, $T = 100$ K,

$\mu = 2.290$ mm⁻¹, $\lambda = 1.54187$ Å, $R_1 = 0.031$, $wR_2 = 0.076$, Flack Parameter^{S1} = 0.005(8).

Drawing Structure of **20o**

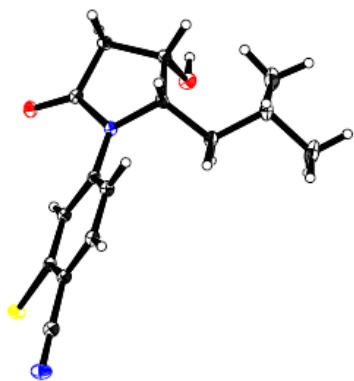
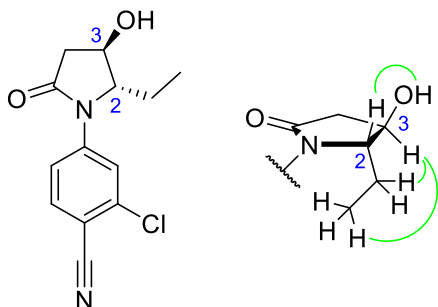


Figure S3. ORTEP of **20o**, thermal ellipsoids are drawn at 30% probability.

S4 NMR 解析 (NOESY) を用いた **20e,i,m** の相対配置の決定

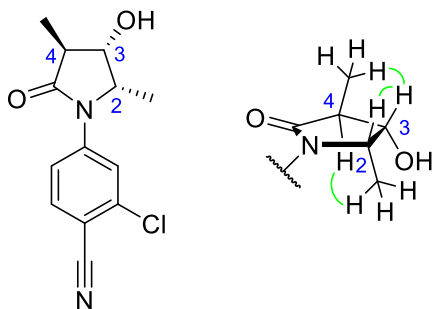
2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*R*)-2-ethyl-3-hydroxy-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (**20e**)

^1H - ^1H NOESY (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\text{H2}/\text{OH}$; $\text{H3}/\text{CH}_2\text{-CH}_3$.



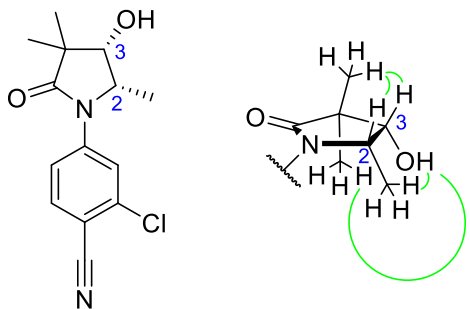
2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*,4*S*)-3-hydroxy-2,4-dimethyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (**20i**)

^1H - ^1H NOESY (600 MHz, CD_3CN): $\text{H3}/\text{H2}$, C4-CH_3 ; $\text{H4}/\text{C2-CH}_3$.



2'-Chloro-4'-[(2*S*,3*S*)-3-hydroxy-2,4,4-trimethyl-5-oxopyrrolidin-1-yl]benzonitrile (**20m**)

^1H - ^1H NOESY (600 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): $\text{CCH}_3\text{CH}_3/\text{H3}$, H2 ; $\text{OH}/\text{CCH}_3\text{CH}_3$, C2-CH_3 .



S5 Supplementary Table 1: **20f** と AR LBD との共結晶構造解析データ

格子定数・空間群などの結晶学的パラメータと構造精密化後の最終構造の統計値

Crystal	AR_WT / 20f
Crystal ID	168106c8A
Data collection	
Beamline	5.0.3 (ALS)
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Unit cell dimensions	
a, b, c (Å)	54.7, 65.6, 70.9
α , β , γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	40 - 1.44 (1.46–1.44)
Observed reflections	88987
Unique reflections	47137
Redundancy	4.6 (4.0)
Completeness (%)	99.6 (97.0)
I/ σ	30.1 (2.0)
R _{sym} ^a	0.040 (0.652)
R _{meas} ^b	0.051

$R_{\text{pim}}^{\text{b}}$	0.020
Molecules in ASU	1
Refinement	
Resolution (Å)	40–1.44 (1.48–1.44)
Reflections	44486
$R_{\text{work}}^{\text{b}}$	0.193 (0.273)
$R_{\text{free}}^{\text{b}}$	0.217 (0.284)
Number of atoms	
Protein	2068
Ligand/Ion	28
Water	159
Glycerol (molecules)	3
Average B factor (Å ²) ^d	16.7
Rms deviation from ideal geometry	
bond lengths (Å)	0.005
bond angles (°)	0.95
Ramachandran plot (%) ^e	
Preferred regions	99.2

Allowed regions	0.8
Outliers	0.0
PDB code	5V8Q

^a $R_{\text{sym}} = \sum_h \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$, where $\langle I(h) \rangle$ is the mean intensity of symmetry-related reflections. ^b R_{meas} ($=R_{\text{rim}}$) and R_{pim} were calculated with SCALA in the CCP4 program suite. $R_{\text{meas}} = \sum_h [N/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$, $R_{\text{pim}} = \sum_h [1/(N-1)]^{1/2} \sum_i |I(h)_i - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i \langle I(h) \rangle$. ^c $R_{\text{work}} = \sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|| / \sum |F_{\text{obs}}|$. R_{free} was calculated for randomly chosen 5% of reflections excluded from refinement. ^d B-factor includes contributions from TLS parameters. ^e Calculated with Coot. Values in parentheses are for the highest resolution shell.

S6 Supplementary Table 2 : 代謝安定性

代謝安定性は第三章の実験項に記載の方法に従って検討を行った。

Compd.	Metabolic stabilities (μL/min/mg)	
	Human	Rat
20a	6	13
20b	0	-10
20c	3	8
20d	2	24
20e	-3	1
20f	-1	20
20g	2	20
20h	-15	0
20i	2	4
20j	5	32
20k	152	220
20l	2	6
20m	1	8
20n	-3	-6
20o	-19	41
20p	N.D.*	N.D.*

*N.D.; Not determined.

S7 Supplementary Table 3 : **20c** の薬物動態 (CrI:CD(SD) rat, male).

薬物動態は第三章の実験項に記載の方法に従って検討を行った

p.o. (1 mg/kg)			
C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-24h} (ngh/mL)	MRT (h)
1073.6	3.33	7336.9	4.06

^aData are expressed as the mean ± S.D. (*n* = 3).

S8 References

S1) Flack, H. D. *Acta Cryst. A* 1983, 39, 876–881.

S2) M.C. Burla, R. Caliandro, M. Camalli, B. Carrozzini, G.L. Cascarano, L. De Caro, C.

Giacovazzo, G. Polidori, D. Siliqi, R. Spagna, SIR2008: Program for the Solution of Crystal

Structures from X-ray Data, CNR Institute of Crystallography, Bari, Italy, 2007.

S3) Sheldrick, G.M. *Acta Cryst. A* 2008, 64, 112–122.

本論文に関わる研究業績

1. Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs). Part I

Bioorganic & Medicinal Chemistry 23, (2015) 2568-2578

2. Synthesis and biological evaluation of novel selective androgen receptor modulators (SARMs) Part III: Discovery of 4-(5-oxopyrrolidine-1-yl)benzonitrile derivative 2f as a clinical candidate

Bioorganic & Medicinal Chemistry 25, (2017) 3330–3349

謝辞

本論文を作成するにあたり、またこの度の学位取得にあたり、筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻 臼井 健郎教授に懇切な御指導、御高配を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

本論文の審査をして頂き、有益なる御助言、御指導を頂きました筑波大学大学院生命環境科学研究科生物機能科学専攻 深水 昭吉教授、谷本 啓司教授、高谷 直樹教授、田中 俊之教授に深く感謝いたします。

本研究の機会を与えてくださいました基武田薬品工業株式会社医薬研究本部長 大川 滋紀博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の共同研究者で、研究遂行及び論文発表に際して、終始熱心な御指導と多大な御協力を賜りました 元癌創薬ユニット主席研究員 山本哲史博士、蓮岡淳博士、原隆人博士、山岡万寿夫博士に深く感謝いたします。

本論文を作成するにあたり、有益な御助言とご指導を頂きました元がん創薬ユニットリサーチマネージャー 石川智康博士に心より御礼申し上げます。

合成実験を担当して頂きました、故宮脇敏夫氏、飛高武典氏、田坂招弘博士、白石充博士、浅野盛輝博士、小野宏司博士に深く感謝いたします。生物実験を担当して頂きました日下雅美博士、神崎直之氏、森本恵氏、山東尚氏、中山正治氏に厚く御礼申し上げます。薬物動態試験を担当して頂きました、藤田央氏に深謝いたします。安全性

試験を担当して頂きました神鳥仁志氏に深く感謝いたします。計算科学を担当して頂きました今井友美博士に厚く御礼申し上げます。X線結晶構造解析を担当して頂きました羽深典之博士、Jason Yano 博士、Keith Wilsonh 博士、曾我部智博士に深謝いたします。

新規臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター
(SARMs) の合成と生物活性

2019 年 1 月

合川 勝二

新規臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター
(SARMs) の合成と生物活性

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士（生物工学）学位論文

合川 勝二

新規臓器選択的アンドロゲン受容体モジュレーター (SARMs) の合成と生物活性 二〇一九年一月 合 川 勝 二