

201414017A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等実用化研究事業
(免疫アレルギー疾患実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)

IgE抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究

平成26年度 総括研究報告書

研究代表者 石井 保之

平成27(2015)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

IgE抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究 ----- 1

石井保之

(資料1) Familiarization of the Synthesis of RCAI-56*¹ (AMRI社最終報告書)

(資料2) アルファガラクトシルセラミド類縁体の合成方法の確立 (キシダ化学株式会社 最終報告書)

(資料3) RK-569*²のマウス喘息モデルでの薬効評価 (株式会社シミックバイオリサーチセンター (最終報告書)

*¹RCAI-56: RCAI-X化合物単体, *²RK-569: RCAI-Xリポソーム (LRK-15処方)

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 (該当なし)

III. 研究成果の刊行物・別刷 (該当なし)

厚生労働科学研究費補助金総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金難治性疾患等克服研究事業
(免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業 免疫アレルギー研究分野)
総括研究報告書

(課題名) IgE 抑制を標的とするアレルギー疾患治療薬の臨床研究

研究代表者氏名 石井保之

(所属施設名及び職名) 国立研究開発法人理化学研究所統合生命医科学研究センター
ワクチンデザイン研究チーム チームリーダー

研究要旨 ナチュラル・キラーT (NKT) 細胞はそのリガンド化合物によって活性すると、IgE 産生 B 細胞特異的に細胞死を誘導するサイトカイン IL-21 を産生する。本研究課題では、NKT 細胞のリガンド化合物群の中から、マウス *in vivo* IgE 産生抑制に高い活性を示す化合物を選択した後、アレルギー疾患治療薬を目指す開発候補製剤を製造し、GLP 動物試験と早期探索的臨床試験で安全性と有効性を確認する。平成 26 年度は、前年度に開発候補化合物として選定した RCAI-X 化合物の製造とそのリポソーム製剤の最適化、投与レジメ (用量、回数、間隔等) の検討、病態モデルマウスでの薬効評価、および非臨床試験の開始を目指した。RCAI-X 化合物の大量製造の最終段階で不純物の除去が障害となったが、最終的に GMP の純度を満たす RCAI-X 化合物の製造方法を確立することができた。非臨床試験の GLP 動物試験用リポソーム製剤の製造は次年度に繰り越したが、基本処方については薬効試験によりほぼ確定した。

研究協力者

前田典之 日本精化株式会社精密化学品事業
本部リピッド事業部 課長

松本正樹 日本精化株式会社精密化学品事業本部
リピッド事業部 主事

須田昌宏 科研製薬株式会社研究推進グループ
研究企画部 グループマネージャー

田代卓哉 新潟薬科大学薬学部薬化学研究室
助教

風見純一 国立研究開発法人理化学研究所ライフ
サイエンス技術基盤研究センター生命機能動的イ
メージング部門創薬化学基盤ユニット (和光分室)
研究員

小山裕雄 国立研究開発法人理化学研究所ライフ
サイエンス技術基盤研究センター生命機能動的イ
メージング部門創薬化学基盤ユニット (和光分室)
ユニットリーダー

谷口克 国立研究開発法人理化学研究所統合生命
医科学研究センター免疫制御戦略研究グループ

グループリーダー

A. 研究目的:

これまでに、ナチュラル・キラーT (NKT) 細胞リガンドの標準的化合物であるアルファガラクトシルセラミド (α -GalCer) のリポソーム製剤が、IgE 産生を強力に抑制する作用機序を明らかにしてきた。作用機序は 3 つのステージに分けられる。第 1 ステージでは、 α -GalCer リポソームが脾臓辺縁帯 (MZ) B 細胞に優先的に取り込まれた後、MZB 細胞は遊走因子 CXCL-16 を発現する。第 2 ステージでは、CXCL-16 受容体である CXCR6 陽性 NKT 細胞が遊走され、MZB 細胞上の α -GalCer/CD1d を認識することにより NKT 細胞が活性化され IL-21 が産生される。第 3 ステージでは、 α -GalCer リポソームの標的細胞群と共存する IL-21 受容体強陽性の IgE 産生 B 細胞が NKT 産生 IL-21 によって細胞死が誘導される。本研究課題では、 α -GalCer よりも高活性を示す新規 NKT 細胞リガンド化合

物（RCAI シリーズ）の中から開発候補品を選定し、IgE 産生を選択的に抑制する新規アレルギー根本治療薬の開発を目指す。平成 26 年度は、前年度の化合物スクリーニングで選択した RCAI-X 化合物のリポソーム製剤の最適化、投与レジメ（用量、回数、間隔等）の検討、病態モデルマウスでの薬効評価、および非臨床試験の実施を目標とした。

B. 研究方法：

1. RCAI-X 化合物のリポソーム製剤の最適化：前年度に α -GalCer 化合物の *in vivo* IgE 産生抑制効果を指標に最適化したリポソーム製剤 LRK-9 を基本処方として、今年度はさらに RCAI-X 化合物製剤の最適化を目指し、複数の製剤処方を作製する。C57BL/6 マウスの尾静脈に投与後に、マウス脾臓中 NKT 細胞を抗 T 細胞受容体抗体と α -GalCer/CD1d 四量体で二重染色した後、フローサイトメーターで共陽性細胞集団をソートする。細胞から mRNA を抽出し、cDNA を合成した後、リアルタイム PCR 法にて IL-21 発現量を定量する。
2. RCAI-X リポソーム製剤の投与レジメの検討：卵白アルブミン（OVA）とアラムアジュバントで感作した IgE 高産生 BALB/c マウスの尾静脈内に、RCAI-56 リポソーム製剤を投与した後に血中 IgE 値を測定する *in vivo* 薬効評価系を用いて、投与用量、投与回数と投与間隔を検討する。
3. RCAI-X リポソーム製剤の病態モデルマウスでの薬効評価：OVA 感作 BALB/c マウス尾静脈に、RCAI-X リポソーム製剤を投与した後、OVA 経口または吸入による誘発を行い、体重変化と下痢症状観察、血中 IgE 及び IgG 抗体価の測定、気道反応性の評価、気管支肺胞洗浄液中（BALF）の炎症性細胞数と抗体価およびサイトカイン濃度の測定、肺組織の病理組織学的検査を実施する。
4. 非臨床試験の実施：小規模製造用に確立できている RCAI-X 化学合成経路を大量製造用に最適化するため、全工程に使用する材料と合成ルートの再検討を委託製造機関、企業と共同で実施し、GLP 動物試験用標品を製造す

る。

（倫理面への配慮）

動物実験は、「動物の愛護及び管理に関する法律」（昭和 48 年 10 月 1 日法律第 105 号）及びその改正法案「動物の愛護及び管理に関する法律の一部を改正する法律」（平成 17 年法律第 68 号）の第 5 章第 41 条にある動物実験の基本理念である 3R（Replacement, Reduction, Refinement）に関する条項に従い、実験計画を立案した。実験の実施にあたっては「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」（平成 18 年 6 月 1 日文部科学省告示第 71 号）に基づく独立行政法人理化学研究所の動物実験実施規定を遵守した。

C. 研究結果：

1. RCAI-X 化合物のリポソーム製剤の最適化：平成 25 年度の試験で、 α -GalCer 化合物で最適化したリポソーム製剤 LRK-9 処方を基本にして、RCAI-X のリポソーム製剤を 3 種類作製した（LRK-14, 15, 16）。いずれの処方もポリエチレングリコール（PEG）修飾リン脂質を最大の割合（LRK-9 の 3 倍）で封入することができた。また比較対象として LRK-15 類似の処方で作った α -GalCer リポソーム製剤、LRK-13 も調製した。LRK-13, 14, 15, 16 のリポソーム製剤を C57BL/6 マウスの尾静脈にそれぞれ投与し、20 時間後に脾臓 NKT 細胞を単離し、IL-21 mRNA の発現量をリアルタイム定量 PCR 法で解析した。その結果、NKT 細胞中の IL-21 mRNA の発現量は、LRK-16 < LRK-13 < LRK-15 < LRK-14 の順に上昇することを確認した。RCAI-X のリポソーム処方の候補として IFN- γ 産生能が低く、IL-10 産生能が高い LRK-15 を、また比較対象に LRK-16 を選定した。
2. RCAI-X リポソーム製剤の投与レジメの検討：OVA 感作 IgE 高産生 BALB/c マウスの尾静脈内に、LRK-15 または LRK-16 リポソーム製剤を 3 用量（50, 500, 5000 ng/kg）で週 2 回投与した。同様に陰性対照群として、生理食塩水また RCAI-X 不含コントロールリポソームを投与した。4 回投与後と 8 回投与後の血中 OVA 特異的 IgE 抗体価と全 IgE 濃

度を測定した結果、RCAI-X 化合物 4 回投与後の OVA 特異的 IgE 抗体および全 IgE 値は、すべての用量群において有意 ($p < 0.01$ %) な低下が認められ、8 回投与後も同程度に抑制効果が維持されていた。

3. RCAI-X リポソーム製剤の病態モデルマウスでの薬効評価： 食物アレルギーモデルの作製を試みた。OVA 感作 BALB/c マウスに、2 - 3 日間隔で OVA (50 mg) の経口投与を繰り返した結果、IgE 抗体価の上昇と下痢の発症をほぼ全例において認めた。しかしながら OVA 誘発前に、被験製剤 LRK-14, 15, 16 をそれぞれ尾静脈に週 1 回の投与を、5 または 500 ng/kg の用量で 3 回投与する実験では、IgE 抗体価の上昇と下痢症状の軽減は認められなかった。一方、OVA 誘発喘息モデルでは、BALB/c マウスに OVA アラム感作を 1 週間間隔で 3 回実施し、OVA 特異的 IgE 抗体価で平均化し群分けした後、6 日間連続の OVA 吸入誘発を 2 回実施した。被験製剤 LRK-15 を誘発前日に 1 回尾静脈内に 5, 50, 500, 5000 ng/kg の用量で投与した。また陽性対照群には、デキサメサゾン (3 mg/kg) を OVA 誘発 2 時間前に毎日経口投与した。

(ア) 気道反応性： コントロール群の気道抵抗は、MCh 1.56~25 mg/mL 吸入時のいずれにおいても、正常群と比較して有意に上昇した。デキサメサゾン群の気道抵抗の上昇は、MCh 1.56~25 mg/mL 吸入時のいずれにおいても、対照群と比較して有意に抑制された。LRK-15 投与群の気道抵抗の上昇は、0~6.25 mg/mL の MCh 吸入時に有意な変化はみられなかったが、MCh 12.5 mg/mL 吸入時に LRK-15 の 500 及び 5000 ng/kg 投与群、MCh 25 mg/mL 吸入時に LRK-15 の 50, 500 及び 5000 ng/kg 投与群において有意な抑制がみられ、その抑制効果は濃度依存的であった。

(イ) BALF 中の細胞数： 好酸球数において LRK-15 投与の 50, 500 及び 5000 ng/kg 群、リンパ球数において LRK-15 投与の 5000 ng/kg 群が、陰性対照群と比較して細胞数の増加が有意に抑制されてお

り、その抑制効果は濃度依存的であった。また好中球数においても、LRK-15 投与群は陰性対照群と比較して細胞数の増加に抑制傾向が認められた。

(ウ) BALF 中のサイトカインと抗体： LRK-15 投与群は、陰性対照群と比較して濃度依存的に IL-5 の増加が抑制されており、5000 ng/kg 群において有意差が認められた。また IL-13 も 50, 500, 5000 ng/kg 群において濃度依存的に抑制されていた。また OVA 特異的抗体の上昇抑制は IgE が 50 ng/kg 群で、IgG1 抗体が 5, 50, 500 ng/kg 群において有意差が認められた。IgG2a 抗体価は陰性対照と同等レベルであった。全 IgE 値の上昇抑制も 5, 50, 500 ng/kg 群において有意差が認められた。

(エ) 血液中のサイトカインと抗体： サイトカインでは LRK-15 投与群で、陰性対照群と比較して濃度依存的に IL-5, IL-9, IL-13, IFN- γ が、ケモカインではエオタキシン、KC、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β の抑制が認められた。血中 IgE の上昇抑制は認められなかった。

(オ) 組織学的検査 (肉眼的所見)： 正常群及び陰性対照群において、肉眼的所見に特筆すべき変化は認められなかった。LRK-15 投与群は、投与量の増加とともに、肝表面のプラーク及び脾臓の大型化が認められた。

(カ) 組織学的検査 (組織病理学的所見)： LRK-15 投与群は陰性対照群に比べて、気管支と肺における単核細胞の浸潤や杯細胞過形成が濃度依存的に抑制されていることを確認した。

4. 非臨床試験の実施： GLP 動物試験の実施に必要な RCAI-X 化合物の大量製造を実施した。RCAI-X の化学合成は 20 工程を超えていたため、大量製造が難航することが予想されたが、過去に RCAI-X 化合物を少ない工程数で製造した経験がある米国受託製造会社に製造を外注後、さらに国内製薬企業の研究協力も加わった結果、最終標品 2 段階前の中間体を 150 g 以上製造することができた。しかしながら、中間体の純度が目標の 95% 以上を満たさず 86% 前後であったことから、最終標品を合成する過程で、新たな精製工程を付

加する必要が生じた。所内研究協力者により改良された製造工程を使って、国内受託製造会社が中間体約 20g から純度 98%以上の最終標品約 10g を製造することができた。

D. 考察：

1. RCAI-X 化合物のリポソーム製剤の最適化： RCAI-X 化合物による IgE 産生抑制の主要活性成分である NKT 細胞由来 IL-21 の産生を強く誘導できるリポソーム製剤処方 LRK-15 を選択することができた。LRK-15 リポソームを構成するリン脂質には不飽和脂肪酸が含まれているが、他の製剤処方 LRK-14, LRK-16 は不飽和脂肪酸を含まない。リポソームの柔軟性を高める効果がある不飽和脂肪酸を含む LRK-15 リポソームは、細胞内で RCAI-X 化合物を効率よく放出できることが予想された。
2. RCAI-X リポソーム製剤の投与レジメの検討： OVA 感作 BALB/c マウスへの投与実験の結果から、LRK-15（用量 50・5000 ng/kg）を 2 週間に 4 回尾静脈に投与することで、OVA 特異的 IgE 抗体および全 IgE 値を有意に抑制できることが確認された。今後症状が有意に軽減される IgE 濃度をアレルギー疾患ごとに見極める必要があると考えている。
3. RCAI-X リポソーム製剤の病態モデルマウスでの薬効評価： OVA 経口誘発による食物アレルギーモデルマウスでは、LRK-14, 15, 16 いずれもリポソーム製剤の 3 週間 3 回尾静脈投与でも IgE 産生抑制と下痢症状の軽減が認められなかった。一方、OVA 誘発喘息モデルマウスでは LRK-15 の誘発前日の単回投与だけで症状の軽減作用が有意に認められた。血中 IgE 値は抑制されなかったが、BALF 中の IgE 値は有意に抑制されていたことから、アレルギー症状の軽減には、炎症が起きている部位での IgE 産生抑制が重要であることが示唆された。食物アレルギーにおいても、消化管における IgE 産生を抑制できる投与レジメを決めることができれば、

RCAI-X 化合物/LRK-15 が適応することが予想された。

4. 非臨床試験の実施： GLP 動物試験を実施するための最終標品を取得するため、中間体 150g からの高純度の最終標品を得る合成方法は確率した。一方、RCAI-X 化合物の製造工程を短縮化する工程開発が未達成であるため、新たに糖脂質合成化学分野のエキスパートの大学研究協力者との共同研究を開始し、治験薬 GMP 製造に最適な工程数と合成方法を検討する予定である。また RCAI-X のバックアップ化合物として、IL-21 産生能が同等でかつ製造工程数が少ない RCAI-137 をスクリーニングすることができているので、RCAI-X 化合物の GMP 製造プロセスに目処が立たない場合には、バックアップ化合物の開発に切り替えることも検討する。

E. 結論：

今年度は新規 NKT 細胞リガンドである RCAI-X 化合物のリポソーム製剤を最適化し、LRK-15 を選定した。また気管支喘息モデルマウスへの LRK-15 投与実験では、肺中での IgE 値と炎症性細胞浸潤の有意な低下、さらに気道抵抗性の顕著な改善効果を確認し、気管支喘息を適応症とする医薬品開発の方向性を決定することができた。一方、RCAI-X 化合物の治験薬製造プロセス開発が遅滞しているため、次年度に計画している非臨床 GLP 動物試験の開始が遅れる可能性が出ているが、研究開発体制を再構築して遅れを取り戻したい。

F. 健康危険情報

なし

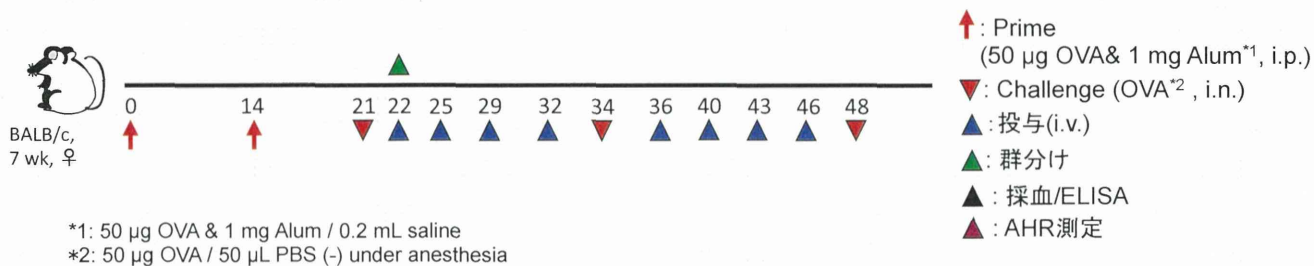
G. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし
- 3.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 「新規擬似糖脂質及びその用途」
(W02008/102888、US 登録, JP, EP 審査中)
- 3) 「アレルギー疾患治療薬」(JP2014/054964)

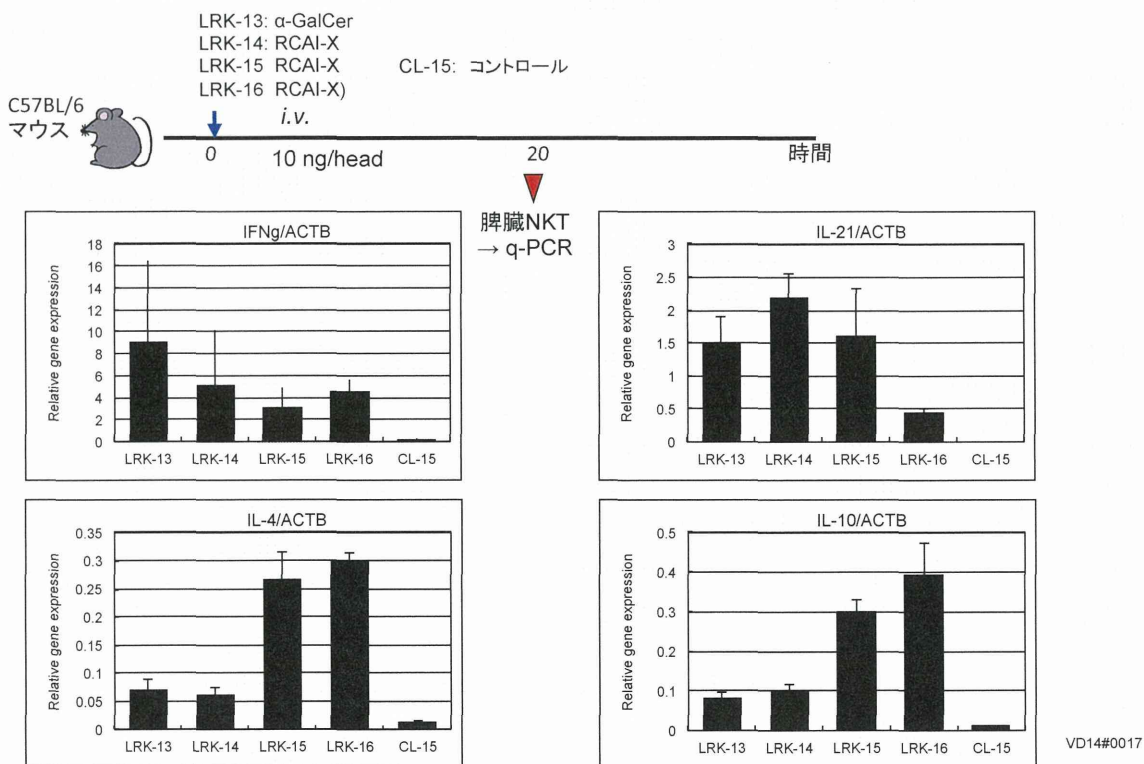
卵白アルブミン感作マウスでの薬効評価



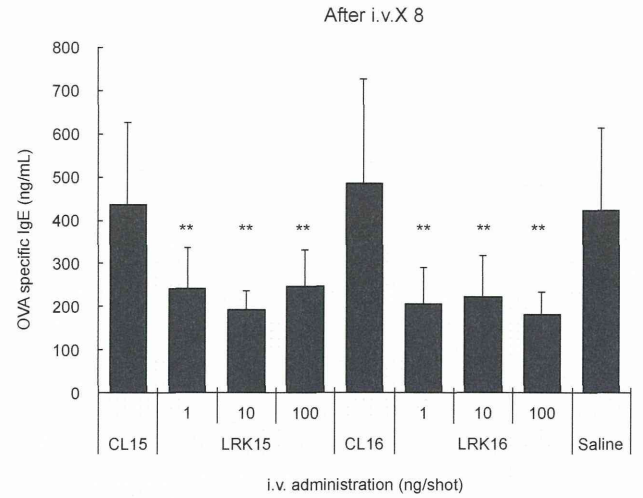
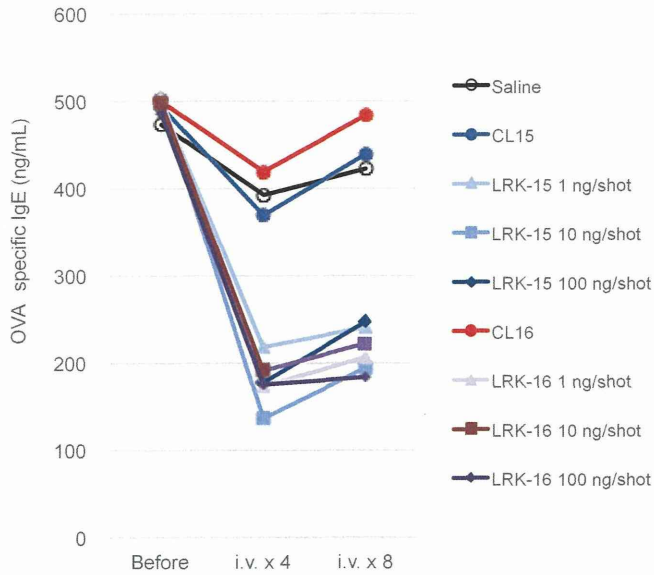
群	投与物	投与量 (ng/shot)	投与量 (ng/kg) ^{*3}	OVA Challenge (µg/head)	例数		
					IgE	AHR	
1	CL15	liposome alone/LRK15	10	400	50	8	4-6
2	LRK15_1 ng	liposomal RCAI-X/LRK15	1	40	50	8	4-6
3	LRK15_10 ng		10	400	50	8	4-6
4	LRK15_100 ng		100	4000	50	8	4-6
5	CL16	liposome alone/LRK16	10	400	50	8	4-6
6	LRK16_1 ng	liposomal RCAI-X/LRK16	1	40	50	8	4-6
7	LRK16_10 ng		10	400	50	8	4-6
8	LRK16_100 ng		100	4000	50	8	4-6
9	Non-challenge	Saline	-	-	Saline	4	4

VD14#0038 *3: マウスの体重を25 gとして換算

リポソーム製剤処方でのスクリーニング

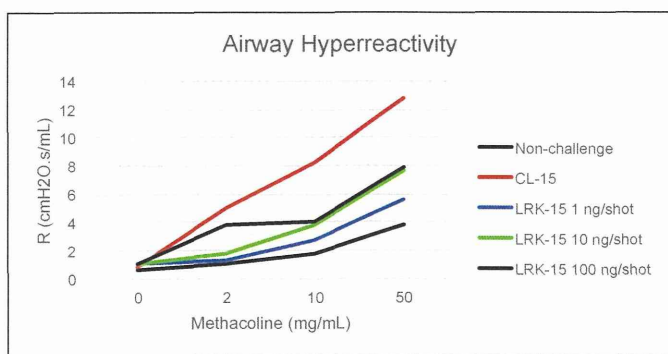


卵白アルブミン感作マウスのIgE産生抑制作用

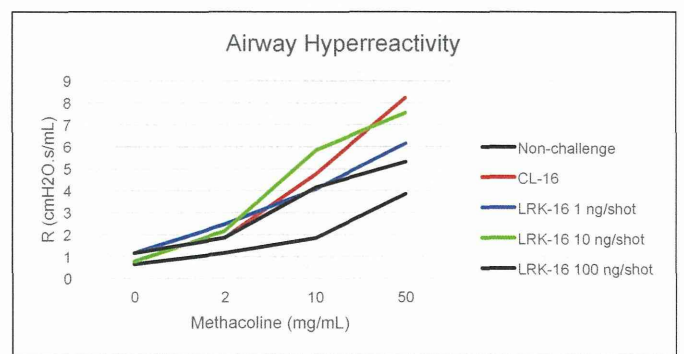


卵白アルブミン感作マウスの気道過敏症抑制作用

LRK-15



LRK-16



CONFIDENTIAL



AMRI[®]GLOBAL
SMARTSOURCING[™]

Albany Molecular Research, Inc. | 7001 Performance Drive | North Syracuse, NY 13212 USA
t. (315) 458-3576 | f. (315) 458-9293 | www.amriglobal.com

March 28, 2014

Yasuyuki Ishii, Ph.D.
Laboratory for Vaccine Design
RIKEN Center for Integrative Medical Sciences
1-7-22 Suehio-chou
Tsurumi, Yokohama 230-0045
Japan

Dear Dr. Ishii:

Please find enclosed our final development report CHD02841 entitled "Familiarization of the Synthesis of RCAI-56."

If you have any questions, please contact me by telephone or E-mail.

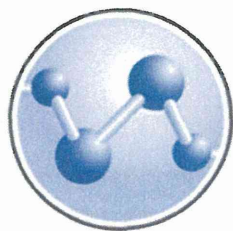
Sincerely,

Jianxie Chen, Ph.D.
Associate Research Fellow
Chemical Development

E-mail: jianxie.chen@amriglobal.com

JC/scb
Enclosure

CONFIDENTIAL



AMRI[®] GLOBAL

SMARTSOURCING[™]

Albany Molecular Research, Inc.
CHD02841

Final Report to
Riken, Japan
Projects: 9067

Familiarization of the Synthesis of RCAI-56

March 28, 2014

Issued By: Lei Liu, Ph.D.
Date: March 28, 2014

Approved By: Jianxie Chen, Ph.D.
Date: March 28, 2014

TABLE OF CONTENTS

Section	Title	Page
1.0	Delivery Summary	3
2.0	Introduction.....	5
3.0	Results and Discussion	11
3.1	Synthesis of Compound A	11
3.2	Synthesis of Compound B	22
3.3	Synthesis of Compound RCAI-56	27
4.0	Experimental.....	28
4.1	Preparation of Compound A	29
4.2	Preparation of Compound B	32
4.3	Preparation of Compound RCAI-56	34
5.0	Analytical (Temporary)	35

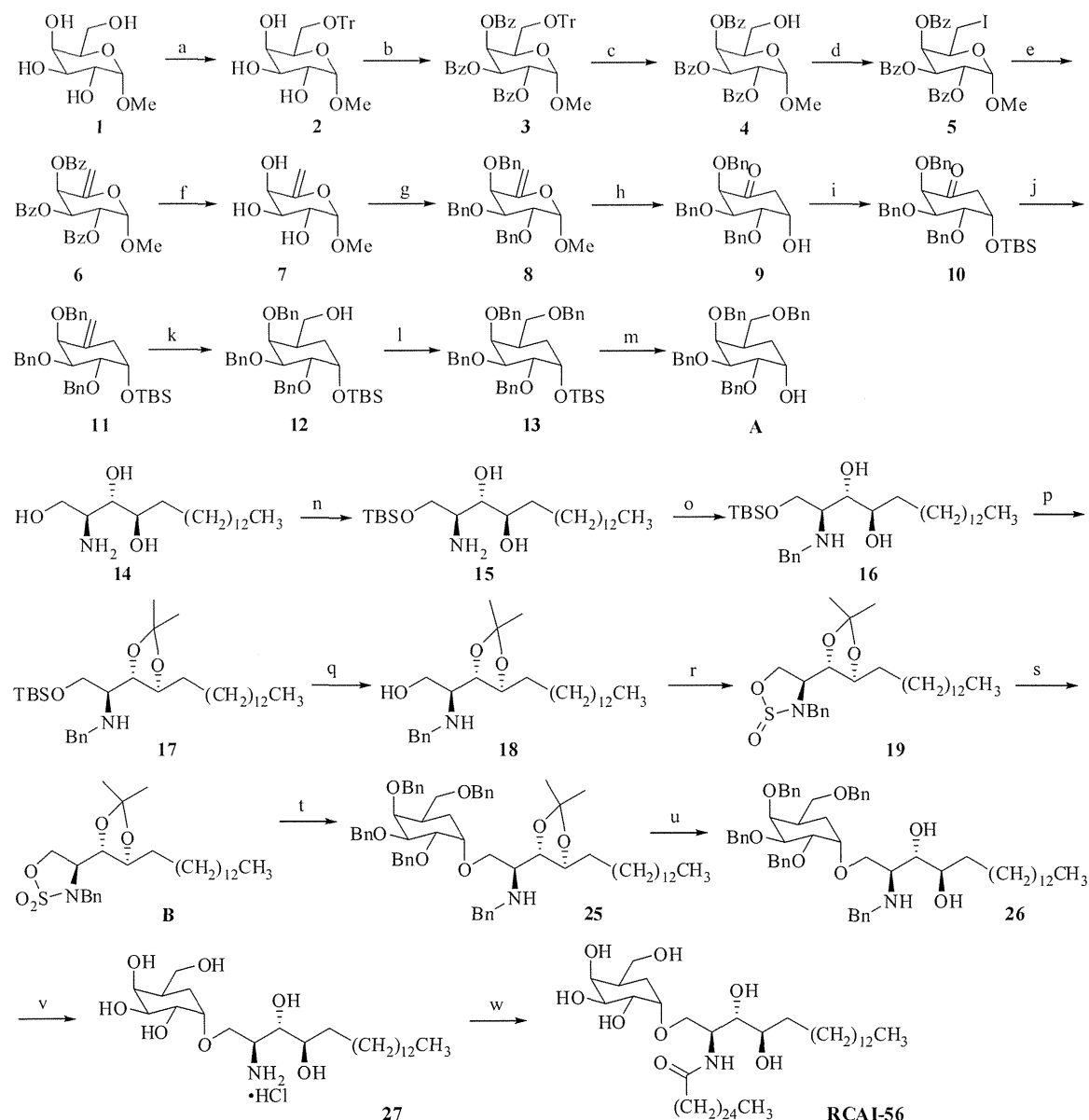
1.0 Delivery Summary

A request was made to Albany Molecular Research, Inc. (AMRI) by Riken, Japan (Riken) to conduct familiarization of the synthesis of compound **RCAI-56**, preparation of 10 g of compound **A**, and preparation of 50 g of **RCAI-56** with limited process development. The project was initiated at AMRI at the Syracuse site in January 6, 2014.

Date Started: January 2014
Date of the Report: March 23, 2014
Chemists: Geetha Banda; Jianxie Chen, Ph.D.; Lei Liu, Ph.D.;
Mary Beth MacBain; and Di Xu

Riken Contacts: Yasuyuki Ishii, Ph.D.

Scheme 1. Final Route of Synthesis of RCAI-56



Conditions: (a) TrCl, DABCO, DCM, rt, overnight; (b) Et₃N, BzCl, DCM, rt, overnight; (c) *p*TsOH, MeOH, DCM, rt, overnight; (d) Imidazole, PPh₃, I₂, toluene, 70 °C, 2 h; (e) DBU, THF, 68 °C, 27 h; (f) NaOMe, MeOH, rt, overnight; (g) NaH, BnBr, *n*Bu₄NI, THF, DMF, 0 °C to rt, overnight; (h) PdCl₂, 1,4-dioxane, water, 60 °C, 6 h; (i) 2,6-lutidine, TBSOTf, DCM, -18 °C to -28 °C, 2 h; (j) Tebbe reagent, pyridine, THF, -40 °C to rt, 4 h; (k) BH₃·THF, THF, 0 °C to rt, 2 h; (l) 2 M NaOH, 30% H₂O₂, 0 °C to 10 °C, 1 h; (m) TBAF, THF, rt, 40 h; (n) TBDMSCl, imidazole, THF, rt, overnight; (o) PhCHO, NaBH(OAc)₃, THF, rt, overnight; (p) DMP, *p*TsOH, rt, 5 h; (q) TBAF, THF, rt, 2 h; (r) Et₃N, SOCl₂, DCM, -35 °C to -45 °C, 1 h; (s) NaIO₄, RuCl₃·H₂O, CH₃CN, water, 0 °C, 1 h; (t) NaH, **A**, THF, DMF, 0 °C to 70 °C, 32 h; (u) *p*TsOH, MeOH, DCM, 60 °C, overnight; (v) Pd/C, HCl, H₂, 50 psi, ethanol, 24 h; (w) Et₃N, C, DCM, MeOH, THF, 0 °C, 1 h

2.0 Introduction

The preparations of compounds **A** (Scheme 2), **B** (Scheme 3), and **RCAI-56** (Scheme 4), were carried out mostly by following the procedure provided by Riken, but there were steps where it was deemed necessary to conduct a truncated development work. This involved development of either the reaction conditions or the isolation protocol.

We have currently almost completed the familiarization of the chemistry toward **RCAI-56** with relatively reproducible yields at most of the steps with exception in the formation of compound **9** due to the close-eluted other isomer. The first two steps on the preparation of compound **B** were changed because the reaction of protecting amine with benzyl group which was the first step in the original scheme had failed to work. We are currently on Step 3 of Scheme 4.

We successfully developed process procedures in some of the steps on a large scale. While currently carrying the intermediates through, based on the experience from the almost completed familiarization, optimizations and developments in some of the steps will continually be conducted. We are confident that 10 g of compound **A** and 50 g of **RCAI-56** will be prepared and delivered.

According to the list of the subjects needed to be conducted in the proposal, we have performed the work with the consideration. During the short time of the familiarization of the chemistry and medium scale reactions, most of the items have been achieved. While the project is on-going, some of the items are being looked at and some work is being planned for the future. Below are the details.

- Improve throughput/yield whenever possible:

For Scheme 2:

The yields from each of the steps were reproducible throughout from the original procedure except the Step 1 and 2 of preparation **A** (Scheme 2). We initially ran the reaction on 30 g of compound **1**, which was double scale to that in the provided procedure. The reaction was monitored by TLC analysis which indicated that the reaction was sluggish and the starting material persistently remained after 1 day. This was observed on the next 100 g scale reaction, in which starting material remained even more shown by TLC analysis. Another reason to seek different reaction condition was to avoid pyridine which was used in the reaction as a solvent, since removing pyridine usually takes time and volumes on large scales. DABCO and dichloromethane were then used in the reaction. By using this condition, the reaction went to completion after 4 hours. In the following step, Et₃N was added due to it being less expensive. In Step 3, we found that amount of *p*-TsOH to use had to be based on pH of the reaction instead of how many equivalents. The yield, after replacing with different reaction conditions, was improved from 36% to 58% in three steps.

Table 1. Yields Comparison on Steps in Scheme 2

Steps	Yields from the Original Procedure	Our Current Yields (Average)	Comments
Step 1, 2, and 3	36%	58%	Changed original reaction conditions.
Step 4 and 5	76%	80%	Currently use HPLC analysis for IPC on Step 5.
Step 6	87%	92%	
Step 7	68%	86%	
Step 8	89%	64%	On our 76 g scale reactions, about 14 g of desired α isomer remained as a mixture with β isomer. If it was isolated, the yield would be about 80%.
Step 9	85%	88%	
Step 10	80%	83%	
Step 11	77%	76%	
Step 12	95%	88%	
Step 13	80%	80%	
Overall	5.7%	9.2%	

For Scheme 3:

The Step 1, reductive amination, was tried by following the procedure described in the journal (*JOC*, **2004**, *69*, 7694–7699) using the common borane reducing reagent, NaBH₄. There were none or trace product formed. Therefore, we chose to protect primary hydroxyl group in the first step and then attach benzyl group to the amine group. On the 20 g scale of starting material, phytosphingosine, the yield for the over two steps was 48%, which was comparable to the yield from the two steps to compound **16** in the original procedure. We are currently working on a larger scale to examine the repeatability.

Table 2. Yields Comparison on Steps in Scheme 3

Steps	Yields from the Original Procedure	Our Current Yields (Average)	Comments
Step 1 and 2	41%	48%	Changed original reaction conditions and intermediate
Step 3	62%	71%	
Step 4	N/A%	96%	
Step 5 and 6	92%	83%	

For Scheme 4:

The reaction of Step 3, deprotection of benzyl group, in Scheme 4 is current in progress. After that, the familiarization of the synthesis will be completed after the final step, coupling with compound **C**.

Table 3. Yields Comparison on Steps in Scheme 4

Steps	Yields from the Original Procedure	Our Current Yields (Average)	Comments
Step 1	62%	70%	
Step 2	89%	77%	
Step 3	N/A	N/A	On-going
Step 4	N/A	N/A	

- Whenever possible, replace column chromatographic purifications by recrystallization, reslurry, etc.:

Compound **5** has been noticed as the solid. Purification of solid compound **5** by recrystallization was examined. The preliminary recrystallization condition will be further examined and implemented on the large scale. We will continue to seek possibility of purification other than chromatography for other compounds during scale-up.

- Establish in-process control for all stages:

In-process control by HPLC analysis was examined. Due to the compatibility with the certain HPLC columns and method, some of the intermediates were not able to show properly. Besides, through the first time run-through the chemistry and without all the intermediates available, the data of IPC was not the depended on the HPLC analysis unless there was a necessity, for example in Step 5 for compound **6**, Scheme 2, in which the HPLC analysis showed the conversion of starting material. TLC and ¹H NMR analyses were the main analysis tools to monitor the reactions. With all the intermediates in hands now, developing HPLC method(s) for all the intermediates and final product will be performed.

- Analyze the in-process and isolated samples by HPLC or GC:

For analyzing IPC samples, see the comment above. For the isolated samples, some of the intermediates were analyzed by HPLC analysis. Due to the compatibility of the compounds and current methods, the purity is needed to confirm after the suitable method(s) are developed. GC analysis will be checked.

- Avoid concentration to dryness, magnesium sulfate treatment, use of unfriendly solvents from all steps of the process:

We have considered these in the project through. So far, dichloromethane has replaced chloroform in Step 1 of Scheme 2. We will try to eliminate magnesium sulfate treatment as much as possible unless it is necessary.

- Conduct stress tests to determine safe hold points:

We have stressed reaction on Step 1, 2, 3, and 5 in Scheme 2. We found that the reaction of Step 5 can not be heated for longer; reaction time for 200 g scale was 27 hours with starting material, compound **5**, less than 5% (AUC) by HPLC analysis. The reaction will be continued to monitor on larger scale. With more amounts of intermediates, we will continue to look into the hold points on other steps, especially Step 8 and Step 10 in Scheme 2, Step 5 in Scheme 3, and Step 1 in Scheme 4.

- Understand and control factors that impact process robustness:

We have identified some steps which could impact the process and scale-up, such as Step 8 and Step 10 in the synthesis of compound **A** (Scheme 2), Step 1 and 2 in the synthesis of compound **B** (Scheme 3), and Step 1 and 3 in the synthesis of **RCAI-56** (Scheme 4). More development work is needed in these steps.

Step 8 in Scheme 2 generated stereoisomers which are difficult to separate by chromatography on large scale, besides it is unknown if the stereoisomer ratio changes with the scale.

Step 10 in Scheme 2 involved Tebbe reagent which is expensive and the work-up of the reaction generated sticky solid. Alternative reagent or conditions, such as Petasis's dimethyltitanocene (DMT) and Wittig, are thought to try in the future.

Step 1 and Step 2 in Scheme 3 under current reaction condition provided 48% overall yield on 20 g scale. The steps are being scaled up and will check if the yields hold up.

Step 1 in Scheme 4 employed multiple addition of compound **B** during reaction. We have planned to optimize this step to reduce the amount of compound **B** once we have more precursors available.

Step 3 in Scheme 4 is a tedious reaction under original reaction condition. Other reaction conditions using Pd/C or Pd(OH)₂/C under pressurized hydrogenation conditions are being examined.

- Prepare analytical reference standards and markers as necessary:

Intermediates from each step have been retained as analytical references.

- Evaluate safety of each operation:

Safe operations have been considered. In particular, Step 11 in the synthesis of compound **A** (Scheme 2), hydroboration-oxidation, will be re-evaluated due to use of hydrogen peroxide although it was properly quenched during work up. Also, other bases, such as potassium *tert*-butoxide, have been planned to examine to replace NaH in a couple of steps in Scheme 2 and Scheme 4.

- Determine safe hold points (both reaction mixtures and intermediates):

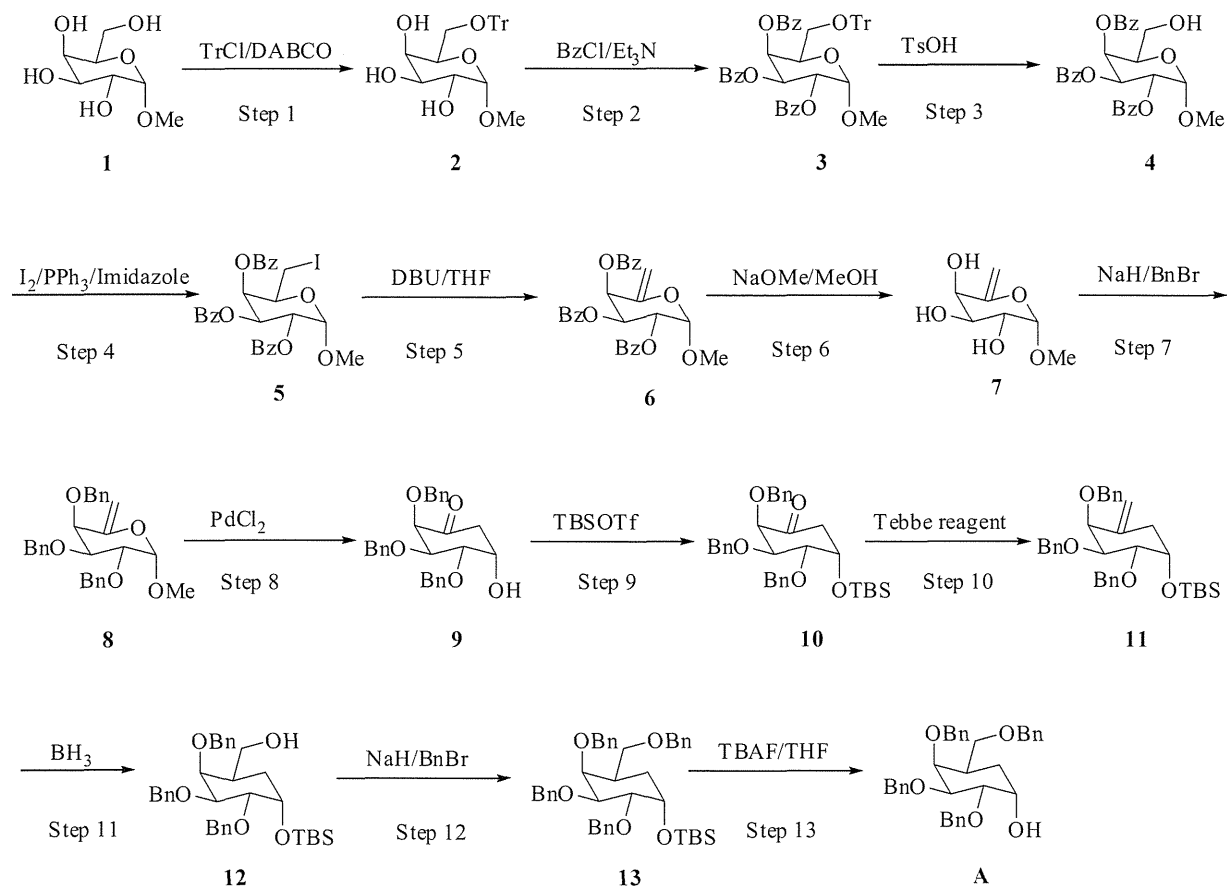
We have identified safe hold points for most of the reactions. Within the short period of the project so far, the stability of the intermediates have not been examined.

- Demonstrate the final process on approximately 50 g scale:

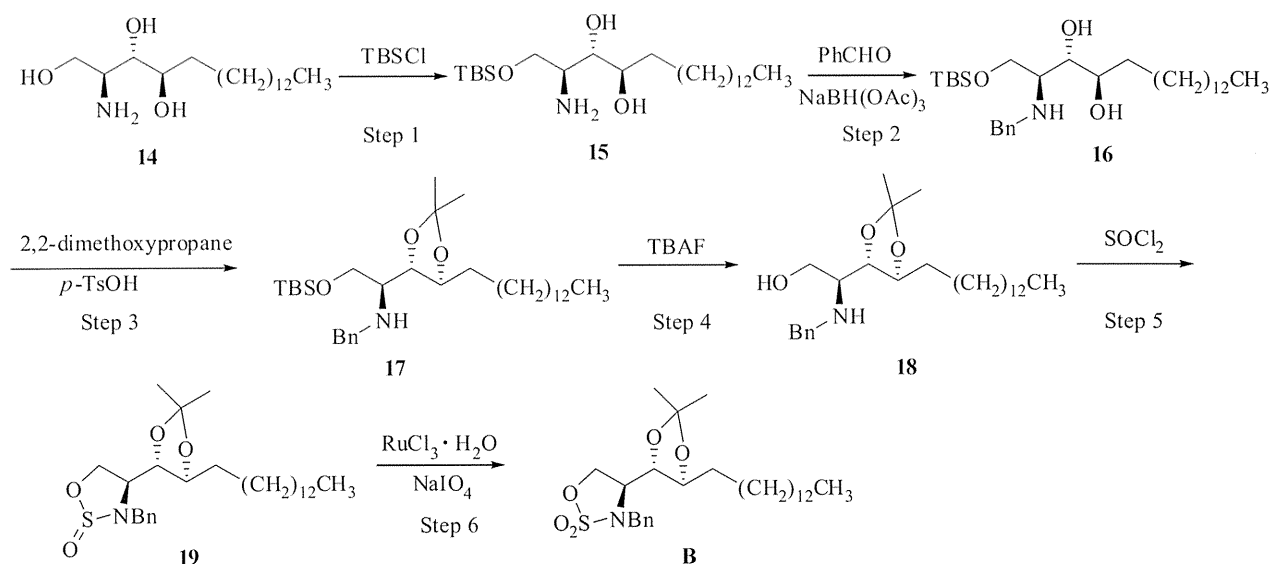
The project is ongoing. We are projecting to have the 10 g of compound **A** prepared by next week. In the meantime, we are continuing to work on the improvement of the process for making 50 g of **RCAI-56**.

In summary, we are close to finishing the familiarization of the chemistry toward **RCAI-56** and have developed process procedures on larger scale for some of the steps. More development work will be carried out in the coming weeks before further scale-up toward the completion of the delivery of 50 g of **RCAI-56**.

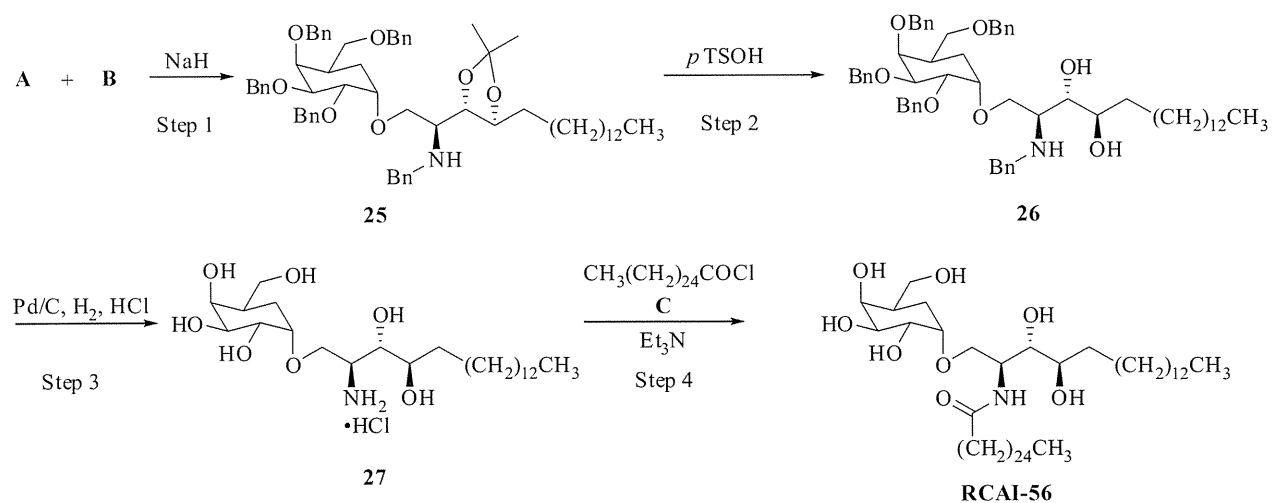
Scheme 2. Synthesis of Compound A



Scheme 3. Synthesis of Compound B



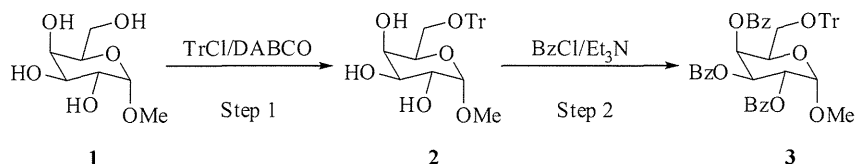
Scheme 4. Synthesis of Compound RCAI-56



3.0 Results and Discussion

3.1 Synthesis of Compound A

Step 1 to Step 2



The two-step reaction was carried out in one pot, without work-up after Step 1. The original procedure for the Step 1 was run on 30 g and 100 g scales in pyridine (16.6 vol) as solvent and 2.2 equivalents of trityl chloride. After 20 to 40 hours, the reaction was not complete by TLC analysis. There was more starting material **1** remaining in a larger scale. The reactions were continued by adding 5 equivalents of benzoyl chloride into the Step 1 reaction mixture. The reactions were complete after overnight, at which time TLC analysis was indicated. The reaction was worked up by extensive aqueous washes to remove pyridine.

The preparation of compound **2** was examined under different conditions. The results are shown in Table 4. ¹H NMR analysis in solvents such as MeOH-*d*₄, DMSO-*d*₆, CDCl₃, cannot differentiate the starting material and the product. Therefore, the reactions were taken to the next step without knowing how much starting material remained. The reaction in 2 equivalents of DABCO, 2 equivalents of trityl chloride, and 20 vol of dichloromethane showed a complete conversion of the starting material **1** besides there was no pyridine involved.