

新規エラスターゼ阻害剤AE-3763の創製ならびに
工業的合成法に関する研究

2010年12月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

井上 泰尚

目次

第1章 緒言

1-1. ヒト好中球エラスターゼ (HNE) と疾患	1
1-2. HNE阻害剤とその阻害機構について	4
1-3. 研究の概要	6
1-4. 引用文献.....	14

第2章 遷移状態安定化機構によるHNE阻害剤の探索

2-1. 研究の目的	16
2-2. 置換基効果とペプチド鎖の短縮	17
2-3. 水溶性基の検討.....	20
2-4. 水溶性基とカルボニル活性基の最適化.....	23
2-5. AE-3763 の薬効薬理・毒性の高次評価について	26
2-6. 考察ならびに小括	31
2-7. 実験の部.....	33
2-8. 引用文献.....	57

第3章 **AE-3763**の工業的合成法検討について

3-1. 研究の目的	59
3-2. 光学活性アミノアルコールの製法検討	59
3-3. 酸化工程の検討	67
3-4. 他工程の改良と初回パイロット合成の実施	71
3-5. 不純物生成機構の解明とその解決法の検討	80
3-6. 考察ならびに小括	89
3-7. 実験の部.....	89
3-8. 引用文献.....	101

第4章 結語

謝辞.....	106
---------	-----

研究業績リスト	107
---------------	-----

略語表

Ac: acetyl、アセチル基

Ac₂O: acetic anhydride、無水酢酸

AcOEt: ethyl acetate、酢酸エチル

AcOH : acetic acid、酢酸

Ala (A): alanine、アラニン

ALI: acute lung injury、急性肺障害

ARDS: acute respiratory distress syndrome、急性呼吸窮迫症候群

Arg (R): arginine、アルギニン

Asn (N): asparagine、アスパラギン

Asp (D): aspartic acid、アスパラギン酸

BALF: bronchoalveolar lavage fluids、気管支肺胞洗浄液

Bn: benzyl、ベンジル基

Boc: *tert*-butoxycarbonyl、*tert*-ブトキシカルボニル

Bu: butyl、ブチル基

i-Bu: isobutyl、イソブチル基

t-Bu: *tert*-butyl、*tert*-ブチル基

t-BuOH: *tert*-butyl alcohol、*tert*-ブチルアルコール

t-BuOLi: lithium *tert*-butoxide、リチウム*tert*-ブトキシド

Bz: benzoyl、ベンゾイル基

Cbz: carbobenzoxy、ベンジルオキシカルボニル

CDI: 1, 1'-carbonyldiimidazole、1, 1'-カルボニルジイミダゾール

CH₃CN: acetonitrile、アセトニトリル

COPD: chronic obstructive pulmonary disease、慢性閉塞性肺疾患

Cys (C): cysteine、システイン

DBSO: dibutyl sulfoxide、ジブチルスルホキシド

DCC: dicyclohexylcarbodiimide、ジシクロヘキシルカルボジイミド

DMAP: 4-(dimethylamino)pyridine、4-ジメチルアミノピリジン

DMF : *N, N*-dimethylformamide、*N, N*-ジメチルホルムアミド

DMSO: dimethylsulfoxide、ジメチルスルホキシド

DMP: Dess-Martin periodinane、Dess-Martin試薬

EDC: 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, 1-エチル
-3-(3'-ジメチルアミドプロピル)カルボジイミド塩酸塩

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay、酵素結合免疫吸着法

ESI: electrospray ionization、エレクトロスプレー法

Et: ethyl、エチル基

Et₂O: diethyl ether、ジエチルエーテル

EtOH : ethanol、エタノール

Et₃N: triethylamine、トリエチルアミン
Gly (G): glycine、グリシン
His (H): histidine、ヒスチジン
HMPA: hexamethyphosphoric triamide、ヘキサメチルリン酸トリアミド
HNE: human neutrophil elastase、ヒト好中球エラスターゼ
HOBt: 1-hydroxybenzotriazole、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール
HPLC: high-performance liquid chromatography、高速液体クロマトグラフィー
IPA: isopropyl alcohol、イソプロピルアルコール
IPE: isopropyl ether、イソプロピルエーテル
iv: intravenous、静脈内投与
Leu (L): leucine、ロイシン
LPS: lipopolysaccharide、リポポリサッカライド
Lys (K): lysine、リジン
NaBH₄: sodium borohydride、水素化ほう素ナトリウム
MC: methylcellulose、メチルセルロース
Me: methyl、メチル基
Met (M): methionine、メチオニン
MeOH: methanol、メタノール
MgSO₄: magnesium sulfate、(無水) 硫酸マグネシウム
Mp: melting point、融点
MS: mass spectrometry、質量分析法
MsCl: methanesulfonyl chloride、メタンスルホニルクロリド
NaH: sodium hydride、水素化ナトリウム
NaHCO₃: sodium hydrogen carbonate、炭酸水素ナトリウム
NaOH: sodium hydroxide、水酸化ナトリウム
Na₂SO₄: sodium sulfate、(無水) 硫酸ナトリウム
NMO: *N*-methylmorpholine-*N*-oxide、*N*-メチルモルフォリン-*N*-オキシド
NMR: nuclear magnetic resonance、核磁気共鳴
PBS: phosphate buffer saline、リン酸緩衝化生理食塩水
Pd(OH)₂: palladium hydroxide、水酸化パラジウム
Ph: phenyl、フェニル基
Phe (F): phenylalanine、フェニルアラニン
po: *per os*、経口投与
Pr: propyl、プロピル基
i-Pr: isopropyl、イソプロピル基
i-PrOH: isopropyl alcohol、イソプロピルアルコール
Pro (P): proline、プロリン
Ser (S): serine、セリン

TBDMS: *tert*-butyl dimethylsilyl、*tert*-ブチルジメチルシリル

TBAB: tetrabutylammonium bromide、テトラブチルアンモニウムブロミド

TBAF: tetrabutylammonium fluoride、テトラブチルアンモニウムフロリド

TFA: trifluoroacetic acid、トリフルオロ酢酸

TFAA: trifluoroacetic anhydride、無水トリフルオロ酢酸

THF: tetrahydrofuran、テトラヒドロフラン

Thr (T): threonine、スレオニン

TLC: thin-layer chromatography、薄層クロマトグラフィー

TMSCF₃: trifluoromethyl trimethylsilane、トリフルオロメチルトリメチルシリ
ン(Ruppert試薬)

TMSO: tetramethylene sulfoxide、テトラメチレンスルホキシド

TPAP: tetrapropylammonium perruthenate、テトラプロピルアンモニウムパー
ルテネート

Trp (W): tryptophane、トリプトファン

TsOH: *p*-toluenesulfonic acid、*p*-トルエンスルホン酸

Tyr (Y): tyrosine、チロシン

Val (V): valine、バリン

第1章 緒言

1-1. ヒト好中球エラスターゼ (HNE) と疾患

蛋白質を必須の構成物質とする生物にとって、プロテアーゼ¹⁾はその機能を発現するための基本的な役割を担っており、蛋白質分解を通して細胞がもつ多彩な生物機能を制御している。それらの生物機能には、細胞周期・増殖・分化、アポトーシス、抗原提示などの主として細胞内での蛋白質分解に基づく現象の他、細胞表面におけるレセプターなどの細胞膜蛋白質、ホルモン、サイトカイン、増殖因子などの代謝、さらには細胞外での分解による細胞外マトリックス代謝、組織構築・器官形成、食物の消化・吸収、血液凝固など、生物の生存そのものにかかわる基本的な生命現象が含まれている。したがって、プロテアーゼ活性の亢進や低下により、多くの疾患が引き起こされる原因となる。このような背景のもと、プロテアーゼと種々の病態との関連性が注目されており、その阻害剤の開発も世界各国で盛んに行われている。

プロテアーゼは活性中心の構造と作用様式により、セリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼの4群に分類される。セリンプロテアーゼは、微生物、動物、植物に広く分布し、その構造と機能について最もよく研究されているプロテアーゼの1つである。そのセリンプロテアーゼの中でも、キモトリプシンはTyr, Phe, Trp等の高分子の芳香族アミノ酸等のC末端を特異的に分解する。またトリプシンはLysやArgなどの塩基性アミノ酸の隣を選択的に分解する。それに対してエラスターゼは上記のアミノ酸を好まず、より小さな非極性アミノ酸のAlaやValなどの隣を分解する。こうした基質特異性は酵素の活性中心のポケット様構造に存在する基底結合アミノ酸の違いに基づくと考えられている。すなわち、トリプシンの場合は基底部に陰性荷電のAsp-189が存在し、LysやArgの陽性荷電側鎖と相互作用する。キモトリプシンの場合は、この部位はSer-189で、芳香族あるいは非極性の大きなアミノ酸側鎖が相互作用できる。一方、エラスターゼの場合も基底部のアミノ酸はSer-189であるが、キモトリプシンではポケット様構造の入口付近のアミノ酸がGlyであるのに対し、エラスターゼではより大きな容積の側鎖をもつValとThrに置換しているため、高分子の芳香族アミノ酸は接近できず、ValやAlaなどの非極性低分子アミノ酸のみが相互作用できる²⁾。

ヒト好中球エラスターゼ (HNE) は、感染症や炎症性疾患時に出現する好中球の顆粒から大量に放出される分子量約3万の中性セリンプロテアーゼで、強力な蛋白分解能をもち異物や微生物の消化に直接働いて生体防御作用を担っている。ところがHNEは基質特異性が低く作用が強力で、Val-X, Ala-X (X: Pro以外のアミノ酸) のペプチド結合を容易に切断することによって、肺、軟骨、血管壁、皮膚などの生体内結合組織の間質を構成する蛋白質エラスチン、コラーゲン、プロテ

オグリカン，フィブロネクチンなどの自己組織も同様に破壊する。

生体内ではHNEは内因性インヒビター蛋白質である α_1 プロテアーゼインヒビター (α_1 -PI)， α_2 マクログロブリン (α_2 -M)，分泌性白血球プロテアーゼインヒビターなどによってその作用が制御されながら生体の恒常性を維持している。しかしながら、炎症部でのHNEの過剰放出やエラスターゼインヒビターレベルの低下によりHNEと内因性インヒビターのバランスが損なわれるとエラスターゼの作用の制御が崩れ、組織が傷害される³⁾。侵襲時のHNEによる肺組織傷害発生機序とその制御の可能性についてFig. 1-1に示した。

すなわち侵襲により炎症性サイトカインの誘導が惹起され、これらのサイトカインが好中球と血管内皮細胞を活性化することで、活性化された好中球が血管内皮細胞に粘着し、炎症部位に集積する。集積した好中球がHNEを放出し、更にこのHNEによってサイトカイン誘導が促進され、好中球が再活性化される。一連のこの反応がHNEの内因性インヒビターである α_1 -PIや α_2 -Mによって制御されていれば、生体防御反応は組織傷害を伴わずに進行する。しかしながら炎症部分でのエラスターゼの過剰分泌や内因性インヒビターレベルの低下によってエラスターゼと内因性インヒビターのバランスが損なわれると、過剰に活性化された好中球から大量のHNEが放出され、そのことによって、1) 好中球より活性酸素の放出を促進し、放出された活性酸素はエラスターゼの内因性インヒビターである α_1 -PIを酸化して、HNE阻害作用を消失させる。2) 白血球の貪食（アポトーシス）を阻害し、炎症反応を増悪させる。これらの機構によって炎症部分でのHNEの過剰放出が起こり、組織傷害が引き起こされる⁴⁾。

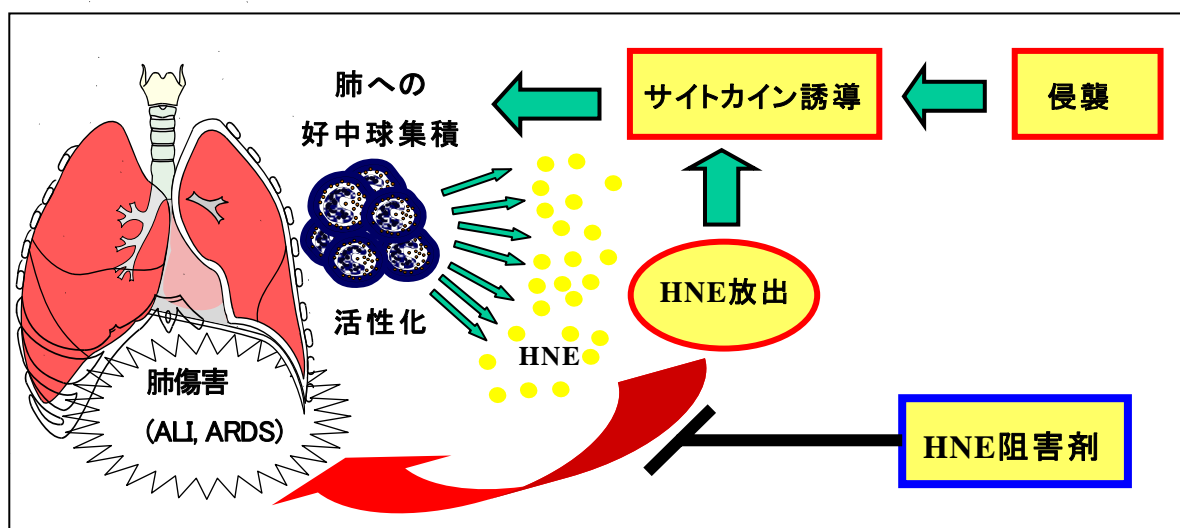


Fig. 1-1 HNEによる肺組織傷害発生機序⁴⁾

このHNEの病態への関与が示唆されている疾患としては、急性肺傷害（ALI）、肺気腫、肺水腫、急性呼吸窮迫症候群（ARDS）、突発性肺繊維症（IIP）、嚢胞性肺繊維症、慢性間質性肺炎、慢性気管支炎、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、びまん性汎細気管支炎、気管支拡張症、喘息、膵炎、腎炎、肝不全、関節リウマチ、関

節硬化症、変形性関節炎、乾癬、歯周病、アテローム性動脈硬化症、臓器移植における拒絶反応、早期破水、水泡症、ショック、敗血症、全身性エリテマトーデス（SLE）、クローン病、播種性血管内凝固症（DIC）虚血 - 再灌流時の組織傷害、角膜搬痕組織の形成、脊髄炎などが知られている⁵⁾。

特にALIとARDSはその病態の同一性⁶⁾からALI/ARDSと呼称され、HNEが主役をなす急性傷害であると考えられている。ALIおよびARDSは肺に加わった直接的、あるいは間接的侵襲（主として感染）に対する肺の非特異的急性炎症反応で、人では主に肺が標的臓器として過剰炎症反応を惹起した結果引き起こされることが考えられており、肺毛細管内皮の広範な損傷を伴う透過性亢進型肺水腫を起こす⁷⁾。また、ALI/ARDSの典型例として敗血症に起因するSeptic ARDSが知られており、その患者の気管支肺泡洗浄液(BALF)から異常に高値の炎症性サイトカイン（TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8）およびHNEが検出されたこと、そしてその際末梢好中球の値が急激に減少することから末梢好中球の肺への移動、集積が推定されることなどから、ALI/ARDSの病態にHNEが深く関与していることが示唆されている⁷⁾。また、動物実験レベルにおいても、HNEの気管支内注入によって各種の動物において出血や好中球浸潤を伴う肺水腫を惹起し得ることはよく知られた事実であり⁸⁾、ハムスターではHNEの気管支内注入後にBALF中への蛋白含量増加、出血が惹起され、引き続き好中球を中心とした炎症細胞の浸潤を引き起こすことが知られている⁹⁾。

次に、HNEのペプチド分解機構をFig. 1-2に示す¹⁰⁾。

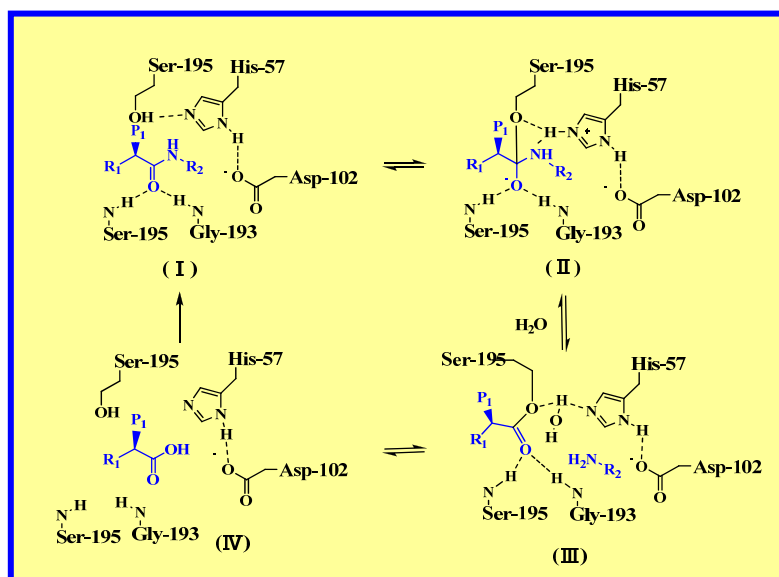
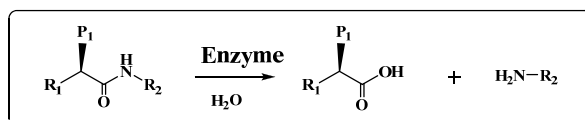


Fig. 1-2 HNEのペプチド分解機構¹⁰⁾

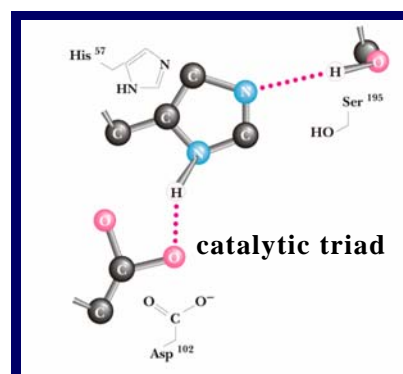


Fig. 1-3 3つ組触媒基¹¹⁾

まず、基質がHNEの各基質結合ポケットによって固定化され、基質の加水分解を受ける位置がSer-195の水酸基の至近距離に位置する（I）。HNEはその活性中心

に3つ組触媒基(catalytic triad)と呼ばれるSer-195, His-57, Asp-102を有し、3次元構造上非常に接近して位置しているこれらのアミノ酸残基との間でプロトンをやりとすることにより、Ser-195の水酸基の反応性を高めている¹¹⁾。(Fig. 1-3) これによってSer-195のカルボニル基への求核反応が起こり、ミカエリス型複合体が形成される。その結果、基質のカルボニル残基がGly-193とSer-195のNH基で構成されるオキシアニオンホールと呼ばれる部位と強力な水素結合を形成することで、HNEへの固定化がより強固となる(Ⅱ)。次にHis-57のイミダゾール基に引かれていた水素が基質のアミノ基の窒素原子に移ることによってペプチド鎖が切断され、アシル酵素複合体が形成される(Ⅲ)。その後水分子がプロトンドナーとなってアシル酵素複合体の加水分解が起こり、再びSer-195が活性化された状態となる(Ⅳ)。

1-2. HNE阻害剤とその阻害機構について

感染や外傷による侵襲、虚血、循環不全等で引き起こされる種々の重要臓器の障害は、しばしば重篤な急性症状や慢性疾患に至らしめるが、これまでその治療に有効な手段はほとんどない状態である。一方、肺を中心にこの組織障害に好中球から放出される活性酸素やHNEが主要な役割を果たしていることが多くの基礎や臨床研究で実証されている。

そのような背景からHNE阻害剤の必要性が認識され、HNEの内因性インヒビターの弱点を克服し得る多くの低分子合成阻害剤が研究されている¹²⁾。それらの中でHNEの阻害メカニズムによって、1) acyl-enzyme形成に起因するタイプの阻害剤、2) HNEとの遷移状態安定化に起因するタイプの阻害剤に分類される(Fig. 1-4, 5)。

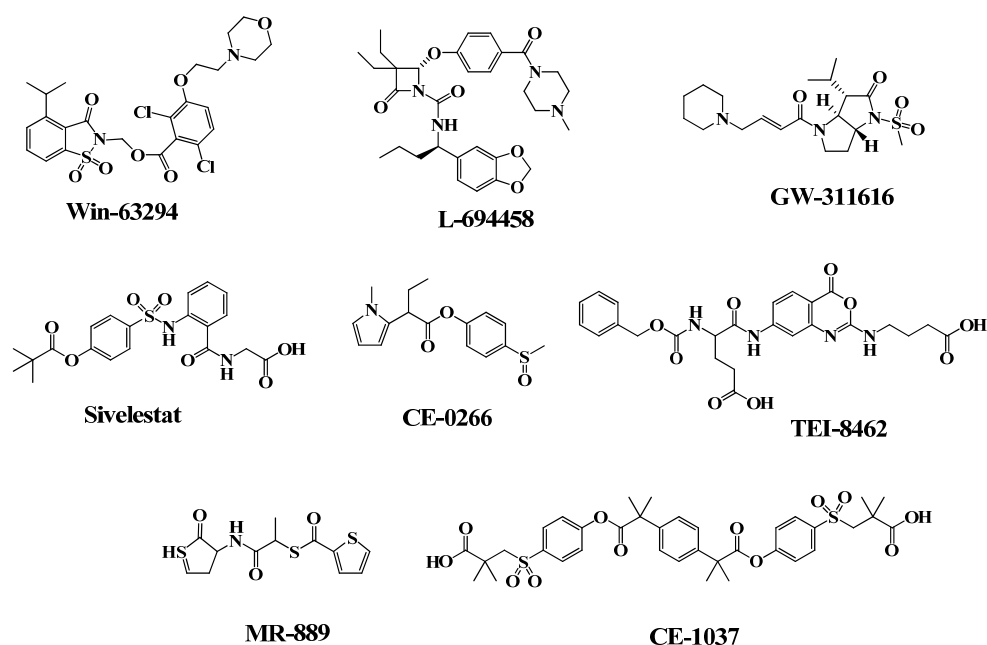


Fig. 1-4 acyl-enzyme形成に起因するタイプの阻害剤

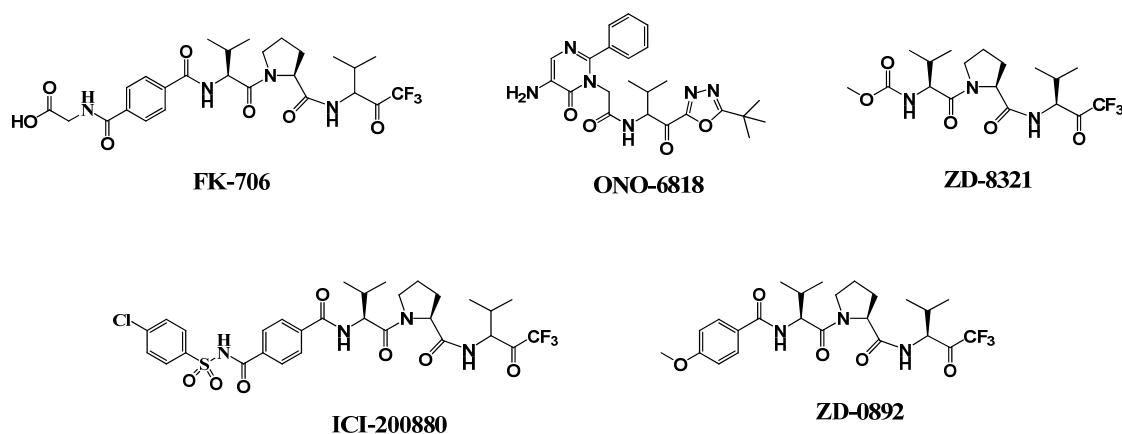


Fig. 1-5 HNEとの遷移状態安定化に起因するタイプの阻害剤

それらのうち、現在世界で唯一上市されているSivelestat¹³⁾に代表される、HNE阻害メカニズムがacyl-enzyme形成に起因するタイプの阻害剤は、その構造中に活性エステル構造を有することから加水分解を受けやすく、血中で不安定なためその強い*in vitro*阻害活性と比較し*in vivo*薬効が弱いものが多かった (**Fig. 1-6, a**)。この様なタイプの阻害剤はsuicide inhibitorと呼ばれており、一般的に化学的に不安定で、この不安定さが*in vivo*薬効を減弱させる大きな要因になっている。

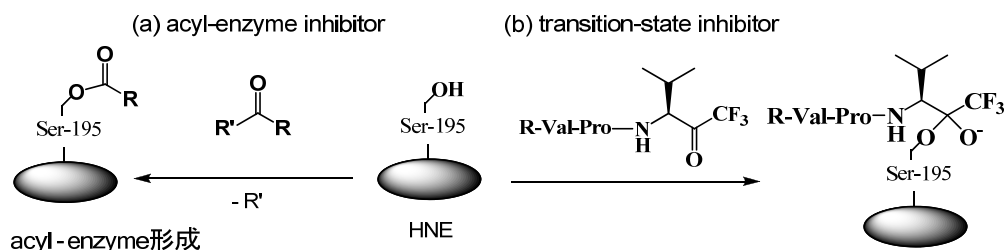


Fig. 1-6 HNE阻害剤の阻害機構

そこでsuicide inhibitorとは異なる、生体内での安定性が高い阻害剤の探索を目指して新しいドラッグデザインを行った。新しいHNE阻害剤のターゲットとして、遷移状態安定化に起因する阻害様式に着目した。(**Fig. 1-6, b**) このタイプの阻害剤はその活性中心が化学的に安定であるため、強い*in vivo*薬効が期待できる。更にこのメカニズムの阻害剤は、HNEによるペプチド鎖の加水分解に最も重要な部位と考えられているSer-195およびオキシアニオンホール (**Fig. 1-7**) との両方同時に強力な相互作用を形成することによって、より強力なHNE阻害作用が期待できる¹⁴⁾。

遷移状態を安定化させる構造として、ベンゾオキサゾールケトン類、ハロアルキルケトン類、及びジケトエステル類等が挙げられるが、本研究ではまずベンゾオキサゾールケトン¹⁵⁾ (**Fig. 1-8**) に注目した。その理由として、ハロアルキルケトン類と比較してほとんど研究されていないこと、そのベンゼン環へ種々の置換基導入が容易で、活性中心より右側に存在すると予想されるポケット (S1') と、導入した置換基 (X) との相互作用によって阻害活性の上昇が見込めること、更

に置換基導入による電子的な効果により α 位のカルボニル基が更に活性化され、阻害活性の上昇が期待できることなどが挙げられる。

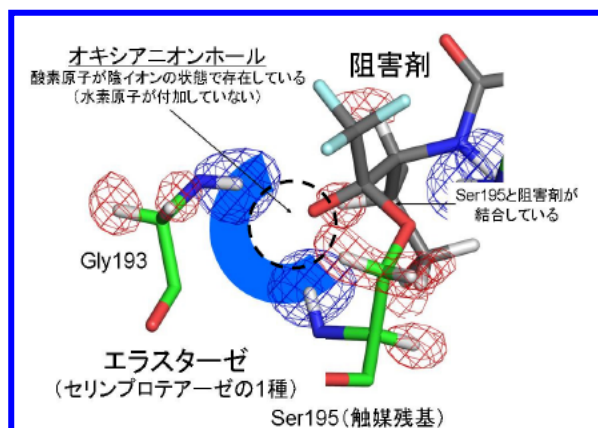


Fig. 1-7 オキシアニオンホールとの結合¹⁴⁾

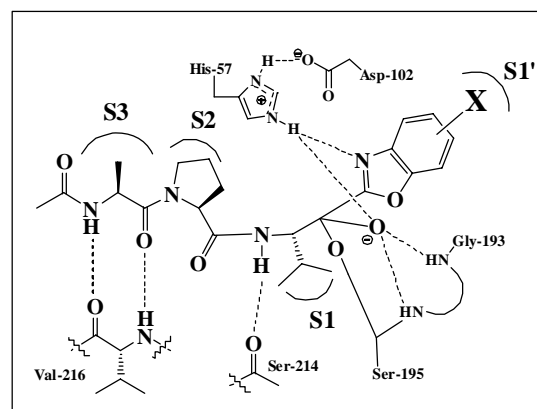


Fig. 1-8 遷移状態安定化阻害剤の阻害機構¹⁵⁾

一方、1992年にEdwardsらによって、トリペプチド鎖 (Val-Pro-Val) を有する α -ケトベンゾオキサゾール誘導体とHNEとの結合様式がX線解析によって示され¹⁵⁾

(Fig. 1-8)、HNEのS1, S2, S3とトリペプチド鎖との相互作用、カルボニル基へSer-195の水酸基が攻撃して生じたオキシアニオンとSer-195とGly-193との相互作用、そしてHNEのVal-216のアミド基とトリペプチド鎖との相互作用がHNE阻害に重要であることが示された。一般に、ペプチド性の化合物の生体内での安定性を向上させる手段として、ペプチド鎖をペプチドミメティックにする方法が考えられる。そこでHNE阻害作用発現に重要な部位のうち、HNE阻害に必須なS1と相互作用するValのみを残し、S2と相互作用するProあるいはS3と相互作用するValを省略することによる活性の減少に対し、ベンゾオキサゾール基への置換基導入による阻害活性の上昇により、全体として化合物の化学的な安定性及び阻害活性の増強がはかれると考え、本研究に着手した。

1-3. 研究の概要

こうした背景に基づき、急性肺障害を中心とする急性期の臓器疾患を対象として、これに深く関与すると思われるHNEの阻害剤は、この臓器疾患の有望な治療薬となり得ると考えられることから、とりわけ急性期の臓器傷害時に高用量投与可能な高水溶性かつ低毒性な注射剤の開発を目的として本研究を開始した。またその構造的特徴として、1) カルボニル活性基を持つ、2) HNEのS1, S2, S3等と相互作用する部位を持つ、3) 水溶性向上のための構造 (水溶性基部分) を持つ、化合物の探索を行った。(Fig. 1-9)

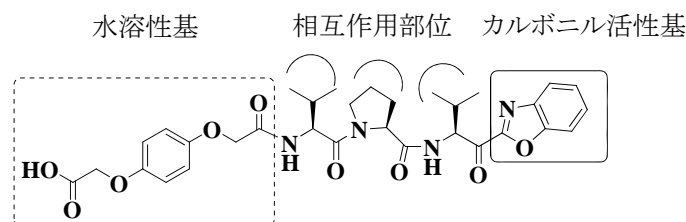


Fig. 1-9 探索化合物の構造的特徴

ベンゼン環への置換基導入効果を確認するために (**Fig. 1-10**)、化合物**1**のベンゾオキサゾール4位を中心として種々の置換基を導入した結果、化合物**2**等に*in vitro*阻害活性の向上が見られた。そこで末端のValを省略することにより非ペプチド性の化合物とし、注射剤とするため水溶性基をProのN末端側に導入した化合物**3**を合成した。化合物**3**はその構造中にピバロイルエステル部分を有するが、ピバロイル基を有さない化合物**3a**にもほぼ同程度の*in vitro*阻害活性が認められたことから、活性中心は α -ケトベンゾオキサゾール部分であると推察される。化合物**3**をエラスターゼ誘発肺出血モデルで評価したところ、期待したとおり抑制作用を示したものの、後肢硬直及び死亡など重篤な毒性が観察された。この毒性はペプチド鎖部分をPro-Valとし、Proの左側に水溶性基を導入した化合物に共通して認められたことから、このタイプの化合物の探索は断念した。一方ペプチド鎖をVal-Pro-Valに固定し、N末端側に水溶性基を導入した化合物**4**ではそのような毒性が認められないことから、化合物**4**をリード化合物とし、N末端側の水溶性基の変換により*in vivo*薬効が強く、かつ水溶性の良好な化合物を見いだすことを目指した。

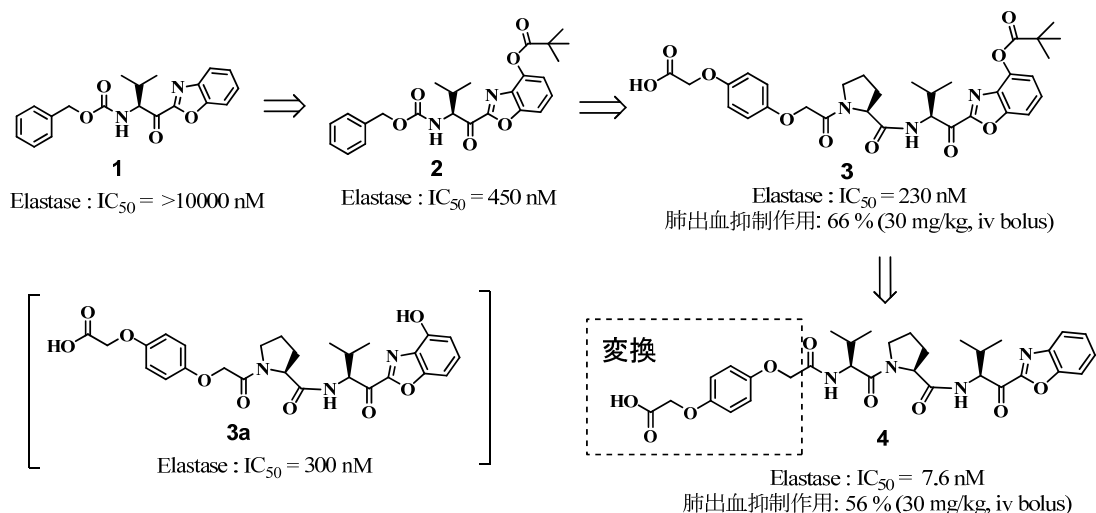


Fig. 1-10 ペプチド鎖短縮とベンゾオキサゾールへの置換基導入効果

まず水溶性側鎖として末端にカルボキシル基を持つ種々の化合物を合成したところ、化合物**4**の水溶性基との結合部分をオキシ酢酸からグリシンアミドへと変換した化合物**5**に*in vivo*薬効の上昇が認められた。したがってこの水溶性基部分は環

状構造及びアミド官能基両方の存在が活性の向上に好ましいことが推察された。そこで、環状構造とアミド官能基を併せ持つ環状アミド化合物**6**を合成したところ、*in vivo*薬効が向上するだけでなく、水溶性も向上 (>100 mg/ml, at pH7) することがわかった。又これら環状アミド構造をもつ化合物は単回投与 (iv bolus) よりも持続投与 (iv infusion) の方がより *in vivo*薬効が強くなることがわかった。(Fig. 1-11)

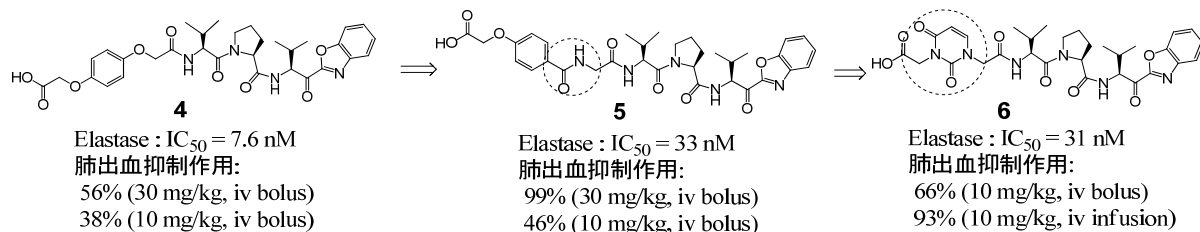


Fig. 1-11 水溶性基部分の変換による*in vivo*薬効の向上

最後に、プロテアーゼ阻害剤のカルボニル活性基として良く知られているCF₃基、ジケトエステル、ジケトアミドをカルボニル活性基として導入し、水溶性基部分とカルボニル活性基の最適化を行った。その結果、各種*in vivo*試験で非常に優れた薬効を示し、優れた物性を示す**AE-3763**を見出した(Fig. 1-12)。 **AE-3763**の水への溶解度はすべてのpHで>1000 mg/ml以上と非常に優れており、またHNE誘発肺障害の抑制作用のED₅₀値は0.42 mg/kg/hr (iv infusion, 70min) および1.2 mg/kg (iv bolus) であった。LPS誘発肺障害モデルに対する最小有効量は1.5 mg/kg/hrで、LPS誘発肺浮腫に対する抑制作用も3 mg/kg/hrから薬効がみられた。LPS/ガラクトサミン誘発多臓器障害マウスの生存率に対する改善効果でも有効性を示し、100 mg/kg, 6回投与群で20例中6例の死亡にとどまり、有意な生存率の改善が認められた。また、安全性の面からも、ラットにおける急性毒性試験の結果、最大無作用量 (NOAEL) が雌雄ラットともに>2000 mg/kg/day以上であることから、**AE-3763**は物性・薬効・安全性の面から、HNEに起因する急性の臓器傷害に対する優れた治療薬として非常に期待される。

以上の内容については第2章で詳細に述べる。

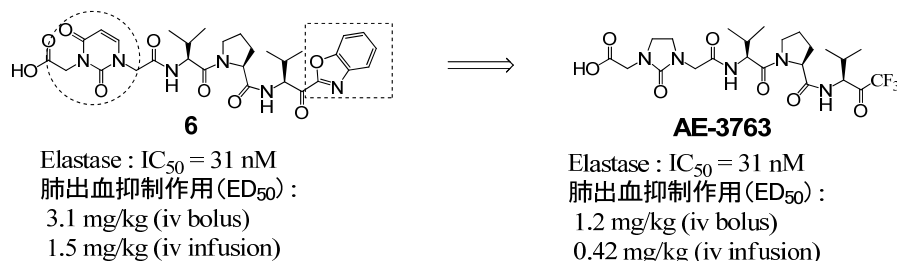


Fig. 1-12 水溶性基とカルボニル活性化基の最適化と**AE-3763**の創製

次に**AE-3763**の合成法について検討を行った。HNEが関与する組織傷害の治療薬、とりわけ急性期に使用可能な注射剤の開発を目的として探索研究を行った結果、薬効、物性および安全性の面から優れた化合物である**AE-3763**を見出し、これを開

発化合物として選択したことは第2章で述べる。その成果をもとにして、工業的に実施可能な**AE-3763**の簡便な合成法の検討を行った。ラボスケールで実施していた**AE-3763**の合成法について**Fig. 1-13**に示す。このラボスケールでの合成法の大きな問題点として、1) 出発物質の化合物**8**がラセミ体のため途中の中間体が結晶化せずカラム精製が必須であり、特に工程の最終段階では (*S,S,R*)-isomerとの分離が必要であった。2) 最終工程で酸化剤として用いているDess-Martin試薬¹⁶⁾ (DMP試薬)は反応系に加えるだけで反応が進行し、カルボニル α -位のラセミ化も進行しないことからラボ合成では優れた合成法であるが、試薬それ自身および中間体が激しい爆発性を有しており、パイロット合成では使用できないことから、より緩和な酸化法の検討が必要であった。

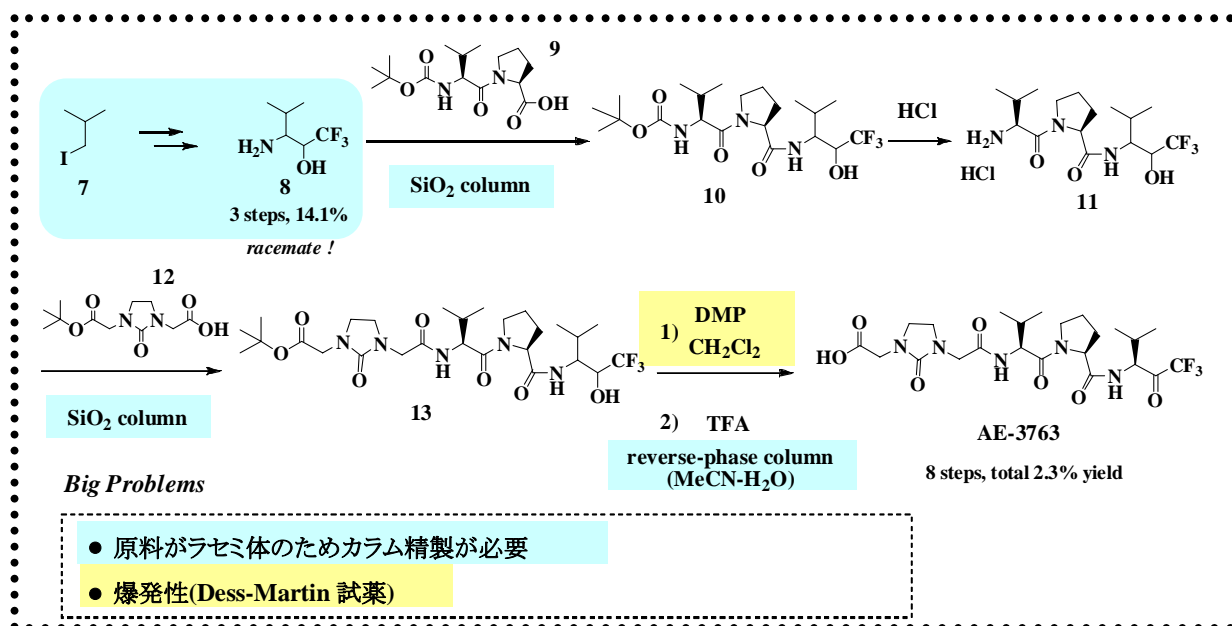


Fig. 1-13 **AE-3763**のラボスケールでの合成法

近年、トリフルオロメチルケトン基($\text{CF}_3\text{CO}-$)を有する酵素阻害剤について、安定性や阻害メカニズムなどの点から興味もたれ、創薬を目的とした合成研究が多数報告されている。

化合物**8**の合成例も多数報告されている¹⁷⁾が、ほとんどがラセミ体での合成で、光学活性体の合成はVeale¹⁸⁾らの他数例報告されているにすぎない。しかもこのVealeらの方法は工程数が長いだけでなく、ラセミ体を原料としているため途中で光学分割を行う必要があり、全収率が低く工業的製法として満足できるものではなかった。(7steps, overall yield 2.7%) また2004年にAndresらから化合物**8**のN-ジベンジル誘導体の立体選択的な合成法が報告¹⁹⁾されたが、(*2S,3S*)と(*2R,3S*)-isomerの生成比は84:16で、両化合物の分離にはカラム精製が必要であった。**AE-3763**の合成を行うためには光学活性な化合物**8**が鍵中間体となることから、この化合物の効率的かつ立体選択的で、かつカラム精製を必要としない合成法の研究を開始した。

一方、Walterら²⁰⁾はValから *N*-Boc-oxazolidine-5-one **16**を経由し、化合物**16**への TMSCF_3 の付加と脱TMS化によって化合物**14**の合成を行ったことを報告した。ここで、化合物**14**がヘミアセタール構造を有する点に着目し、これを還元後、脱保護することによって、目的とする光学活性な化合物**8**が得られると考えられたことから (Fig. 1-14)、化合物**14**のアミノ保護基をより安定で安価なCbz基に変換した化合物**15**を合成し、検討を行った。

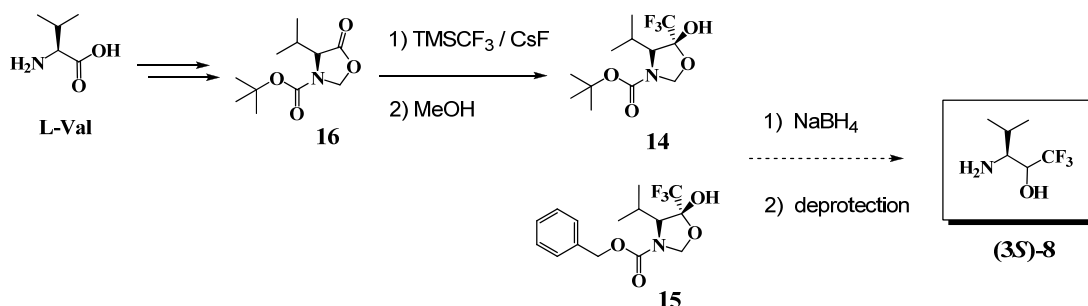


Fig. 1-14 化合物**8**のキラル合成法

その結果、化合物**15**の NaBH_4 還元によって(2*S*,3*S*)-**17a**と(2*R*,3*S*)-**17b**がほぼ1:1の生成比で得られ、続いてaq. K_2CO_3 で加水分解したところ、(2*S*,3*S*)-**18a**と(2*R*,3*S*)-**18b**がほぼ3:1の比で得られ、その他副生成物として化合物**19**およびベンジルアルコールが得られる結果となった。(Fig. 1-15)

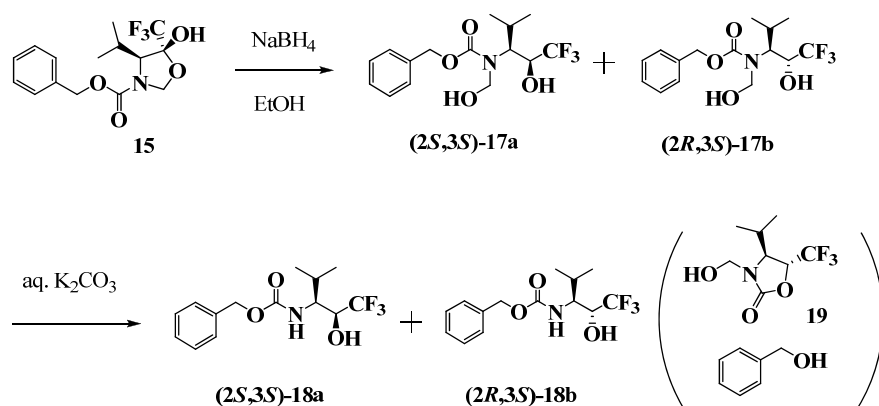


Fig. 1-15 化合物**18**の合成と化合物**19**の副生

副生成物の化合物**19**の推定生成機構をFig. 1-16に示す。すなわち(2*S*,3*S*)-**17a**から化合物**20**が生成するためには、イソプロピル基とトリフルオロメチル基の立体反発のため、(2*R*,3*S*)-**17b**の場合と比較して困難であると思われる。したがってトリフルオロメチルアルコールのカルボニル基への求核反応は進行せずに、ヒドロキシメチル基の加水分解反応が優先し、(2*S*,3*S*)-**18a**が選択的に得られる。一方(2*R*,3*S*)-**17b**の場合は立体的に安定な構造をとるため、ヒドロキシメチル基の加水分解反応だけでなくトリフルオロメチルアルコールのカルボニル基への求核反応

も同時に進行し、化合物**19**およびベンジルアルコールが副生するものと推定される。

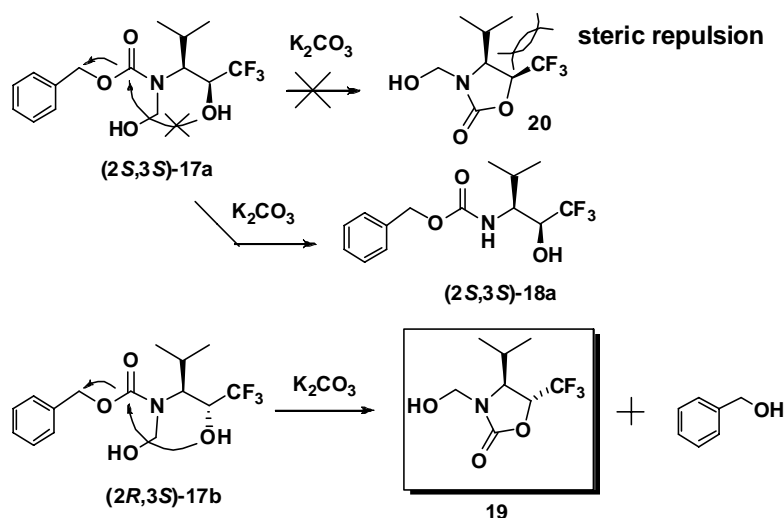


Fig. 1-16 化合物**19**の推定生成機構

一方、**(2S,3S)-18a**は結晶化が可能なことから、この工程で再結晶を行うことでカラム精製が不要になるが、**(2R,3S)-18b**は結晶化しないことに加え、副生した化合物**19**やベンジルアルコールが不純物として混在している場合、晶出が困難になり、その結果収率も低下する。したがって還元反応の立体選択性を向上させることで、**(2S,3S)-18a**の収率、純度の向上が見込めることから、還元反応の検討を行った。

還元剤を $NaBH_4$ に固定し溶媒の検討を行ったところ、*t*-ブチルアルコール、イソプロピルアルコール等嵩高い溶媒で**(2S,3S)-17a** : **(2R,3S)-17b** = 79 : 21と選択性の向上がみられた。一方、反応溶媒に水を添加すると選択性が逆転し**(2R,3S)-17b**が主生成体になることがわかった。これらのことから化合物**15a**のヒドロキシメチル基とカルボニル基との分子内水素結合によってコンホメーションが固定化され、ハイドライドがより立体障害の少ない方から攻撃し、目的とする**(2S,3S)-17a**が優先的に得られている可能性が考えられた。(Fig. 1-17)

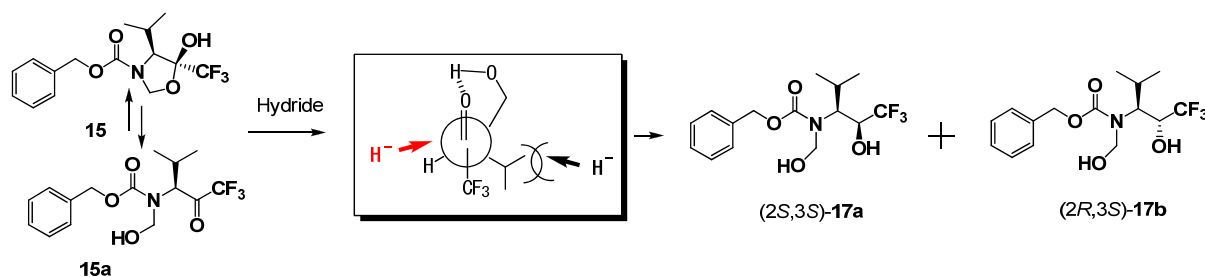


Fig. 1-17 化合物**15**の立体選択的還元

したがって、還元反応の際に酸素原子への配位能が高い金属を添加することによって、分子内水素結合より強固な環状キレート構造を形成させ、コンホメーシ

ョンを固定化させることができれば更なる立体選択性の向上が期待できる。そこで種々の金属試薬、還元剤、溶媒、反応温度の最適化を行った結果、添加する金属としてZnCl₂を用い、*t*-ブチルメチルエーテル中室温でNaBH₄処理することによって立体選択性が(2*S*,3*S*)-**17a** : (2*R*,3*S*)-**17b**=22 : 1 と飛躍的に向上した。また、選択性が向上したことで化合物**19**やベンジルアルコールの副生はみられなかった。続いてアルカリ加水分解後、ヘキサン-イソプロピルエーテル (3:1)より晶出を行うことによってカラム精製することなく、高純度の(2*S*,3*S*)-**18a**が好収率（化合物**15**より収率87%, 純度99%以上）で得られた。

次に酸化反応の検討を行った。探索研究でのトリフルオロメチルアルコールの酸化反応はDMP試薬で行っていた。この酸化法はDMP試薬を反応系に加えるだけで反応が進行し、不斉中心のラセミ化も起こらず、特別な温度制御も必要とせず有害な重金属も使用しないことから少量では非常に優れたトリフルオロメチルアルコールの酸化法²¹⁾である。しかしDMP試薬やその中間体は激しい爆発性を有しており、この酸化法は工業的合成に向かないことから、安全で簡便な酸化法の検討を行った。(Fig. 1-18)

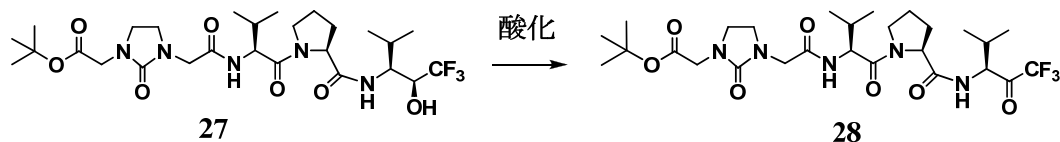


Fig. 1-18 酸化工程

一般的なアルコールの酸化法としてマンガン、クロムやルテニウムを用いた金属酸化法が考えられるが、不純物や分解物が多く、残留金属や処理等の問題がある。実際、化合物**27**の酸化にも適用したが、副反応が多く原料も残留し、純度の高い**AE-3763**を得ることができなかった。酸素酸化や陽極酸化法は不純物や分解物が多く、特殊な装置が必要で製造コストも高くなることが予想されることから、有機化合物、中でもDMSOによる酸化条件の検討を行った。DMSOの活性化剤、溶媒、温度の最適化をおこなった結果、EDCとジクロロ酢酸をDMSOの活性化剤として使用し、酢酸エチルとDMSOの混媒中0℃で酸化反応を行うと、懸念であったトリフルオロメチル基のα位の異性化も起こすことなく反応は進行し、収率90%で純度96%の化合物**28**が得られた。

ラボ合成法の大きな課題であった1) 立体選択的なトリフルオロメチルアルコールの合成、2) 安全で簡便な酸化法、が解決したことから、パイロットスケールでの**AE-3763**の合成を行った。その結果、全8工程、収率12%とラボスケールでの収率2.3%より改善したものの、純度が97.8%と低下し、満足するものではなかった。(Fig. 1-19)

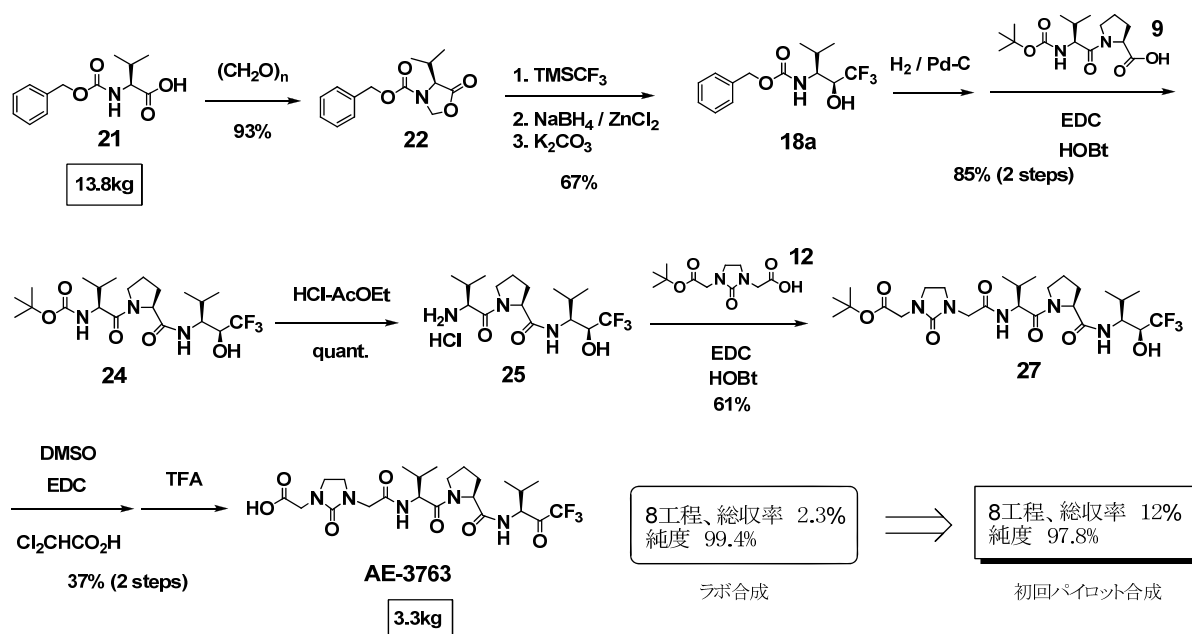


Fig. 1-19 初回パイロット合成法

そこで、各工程において副生する不純物を同定し、その生成機構を推察することによって不純物の生成工程と原因を特定することができれば、**AE-3763**の純度と収率の向上が期待できることから、検討を行った。最後に各工程の最適化を行って、全8工程、総収率28.5%で純度99.2%の**AE-3763**の工業的合成法を確立することができた。(Fig. 1-20)

以上の内容については第3章で詳しく述べる。

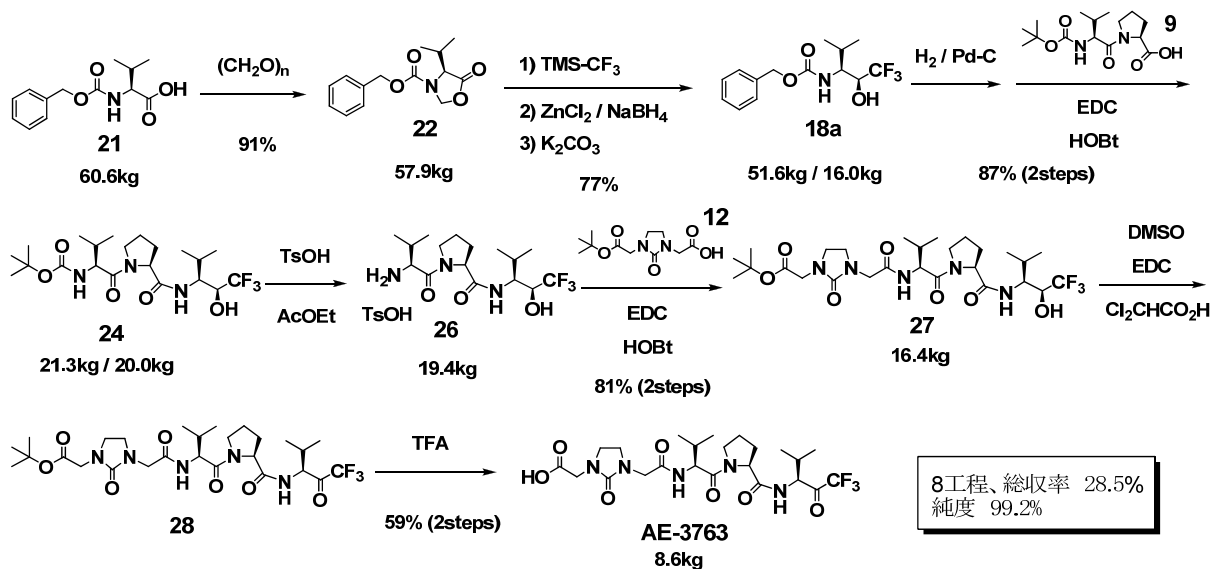


Fig. 1-20 改良パイロット合成法

1-4. 引用文献

1. (a) 木曾良明, 濱田芳雄: プロテアーゼインヒビターからの創薬, 寒川賢治, 南野直人編, **2007**, pp193, 株式会社メディカルドゥ. (b) 木曾良明 *治療学* **1998**, 32, 6. (c) 武谷浩之, 鈴木宏治 *医学のあゆみ* **2001**, 198, 3. (d) 岡田保典 *Mol. Med.* **2002**, 39, 4.
2. 鈴木宏治: プロテアーゼとそのインヒビター, 早石修編, **1993**, pp32, メジカルビュー社.
3. Banda, M. J.; Rice, A. G.; Griffin, G. L.; Senior, R. M. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 4481.
4. Ogawa, M. *Prog. Med.* **2002**, 22, 1019.
5. (a) Merritt, T. A.; Cochrane, C. G.; Holcomb, K.; Bohl, B.; Hallman, M.; Strayer, D.; Edwards, D.; Gluck, L. *J. Clin. Invest.* **1983**, 72, 656. (b) Janoff, A. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1985**, 132, 417. (c) Yasui, S.; Nagai, A.; Aoshiba, K.; Ozawa, Y.; Kakuta, Y.; Konno, K. *Eur. Respir. J.* **1995**, 8, 1. 3. (d) Vender, R. L. *J. Invest. Med.* **1996**, 44, 531. (e) 今井由美子 *呼吸* **2002**, 21, 445. (f) 石橋正義, 吉田稔, *呼と循* **2002**, 50, 609. (g) Taggart, C. C.; Greene, C. M.; Carroll, T. P.; O'Neill, S. J.; McElvaney, N. G. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2005**, 171, 1070. (h) Chua, F.; Laurent, G. *J. Proc. Am. Thorac. Soc.* **2006**, 3, 424. (i) Pham, C. T. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6, 541.
6. Ware, L. B.; Matthay, M. A. *N. Engl. J. Med.*, **2000**, 342, 1334.
7. 窪田達也 *医学のあゆみ* **2001**, 198, 93.
8. 川瀬和一十, 萩尾哲也, 松岡昌三 *日薬理誌* **2003**, 122, 151.
9. Senior R. M.; Tegner, H.; Kuhn, C.; Ohlsson, K.; Starcher B.C.; Pietce, J. A. *Am. Rev. Respir. Dis.* **1977**, 116, 469.
10. Edwards, P. D.; Bernstein, P. R. *Med. Res. Rev.* **1994**, 14, 127.
11. Blow, D. M.; Birktoft, J. J.; Hartley, B. S. *Nature* **1969**, 221, 337.
12. (a) William, A. Z.; Norton, P. P. *Exp. Opin. Ther. Patents* **1999**, 9, 851.; (b) Ohbayashi, H. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2002**, 12, 65.; (c) Ilies, M. A.; Scozzafava, A.; Supuran, C.T. *Exp. Opin. Ther. Patents* **2002**, 12, 1181.; (d) Abbenante, G. ; Fairlie, D. P. *Medicinal Chemistry* **2005**, 1, 71.
13. Kawabata, K.; Suzuki, M.; Sugitani, M.; Imaki, K.; Toda M.; Miyamoto, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 177, 814.
14. Tamada, T.; Kinoshita, T.; Kurihara, K.; Adachi, M.; Ohhara, T.; Imai, K.; Kuroki, R.; Tada, T. *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, 131, 11033.
15. Edwards, P. D.; Meyer, E. F.; Vijayalakshmi, J.; Tuthill, P. A.; Andisk, D. A.; Gomes, B.; Strimpler, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1854.
16. Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 4155.
17. (a) Imperiali, B.; Abeles, R. H.; *Tetrahedron Lett.* **1986**, 27, 135; (b) Edwards, P. D.;

- Andisik, D. W.; Bryant, C. A.; Ewing, B.; Gomes, B.; Lewis, J. J.; Rakiewicz, D.; Steelman, G.; Strimpler, A.; Trainor, D. A.; Tuthill, P. A.; Mauger, R. C.; Veale, C. A.; Wildonger, R. A.; Williams, J. C.; Wolanin, D. J.; Zottola, M. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 1876.
18. Veale, C. A.; Bernstein, P. R.; Bohnert, C. M.; Brown, F. J.; Briant, C.; Damewood, J., J. R.; Earley, R.; Feeney, S. W.; Edwards, P. D.; Gomes, B.; Hulsizer, J. M.; Kosmider, B. J.; Krell, R. D.; Moore, G.; Salcedo, T. W.; Shaw, A.; Silverstein, D. S.; Steelman, G. B.; Stein, M.; Strimpler, A.; Thomas, R. M.; Vacek, E. P.; Williams, J. C.; Wolanin, D. J.; Woolson, S. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3173.
19. Andres, J. M.; Pedrosa, R.; Perez-Encabo, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1558.
20. Walter, M. W.; Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5179.
21. Linderman, R. J.; Graves, D.M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 661.

第2章 遷移状態安定化機構によるHNE阻害剤の探索

2-1. 研究の目的

第1章・緒言でも述べたように、HNEは生体内に存在する最も破壊的なプロテアーゼの一つであり、エラスチン、コラーゲン、プロテオグリカン等の主要な細胞外マトリックス構成成分を分解することで、ALIやARDS等の急性肺障害を中心とする急性期の臓器傷害を発症させる大きな原因となっている。したがってこれらの臓器疾患を対象として、これに深く関与すると考えられているHNEの阻害剤は、これらの臓器疾患の有望な治療薬となり得ると考えられる。本研究では、とりわけ急性期の臓器傷害時に高用量投与可能な高水溶性かつ低毒性な注射剤の開発を目的として本研究を開始した。

またそのHNE阻害メカニズムについて、現在世界で唯一上市されているSivelestat¹⁾に代表される、acyl-enzyme形成に起因するタイプの阻害剤は、その構造中に活性エステル構造を有することから加水分解を受けやすく、化学的に不安定な構造のため*in vivo*薬効が弱いものが多かった。したがって、化学的に安定な構造を有し、かつHNEの活性発現に最も重要な部位と考えられているSer-195およびオキシアニオンホール部位との両方同時に強力な結合を形成することができる遷移状態安定化に起因する阻害様式に着目した。

遷移状態を安定化させる構造として、ベンゾオキサゾールケトン類、ハロアルキルケトン類、及びジケトエステル類等が挙げられるが、まずベンゾオキサゾールケトン²⁾ (Fig. 2-1) に注目した。その理由として、ハロアルキルケトン類と比較してほとんど研究されていないこと、そのベンゼン環へ種々の置換基導入が容易で、活性中心より右側に存在すると予想されるポケット (S1') と、導入した置換基 (X) との相互作用によって阻害活性の上昇が見込めること、更に置換基導入による電子的な効果によりアルファー位のカルボニル基が更に活性化され、阻害活性の上昇が期待できることなどが挙げられる。

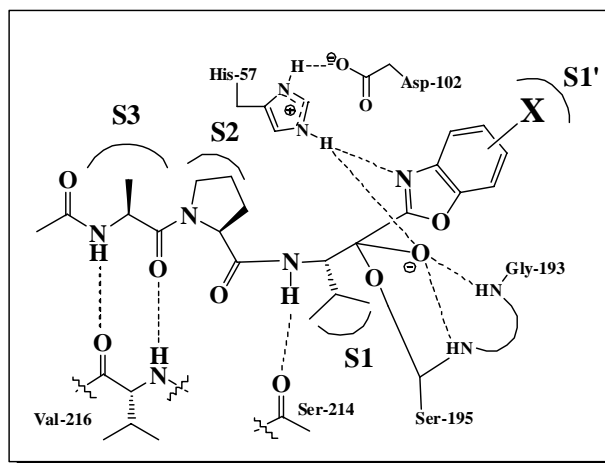


Fig. 2-1 α -ケトベンゾオキサゾールのHNE阻害様式²⁾

一方、1992年にEdwardsらによって、トリペプチド鎖（Val-Pro-Val）を有する α -ケトベンゾオキサゾール誘導体とHNEとの結合様式がX線解析によって示され²⁾（**Fig. 2-1**）、HNEのS1, S2, S3とトリペプチド鎖との相互作用、カルボニル基へSer-195の水酸基が攻撃して生じたオキシアニオンとSer-195とGly-193との相互作用、そしてHNEのVal-216のアミド基とトリペプチド鎖との相互作用がHNE阻害に重要であることが示された。

一般に、ペプチド性の化合物の生体内での安定性を向上させる手段として、ペプチド鎖をペプチドミメティックにする方法が考えられる。そこで本研究では、まずHNE阻害に必須なS1と相互作用するValのみを残し、S2と相互作用するProあるいはS3と相互作用するValを省略することによる活性の減少に対し、ベンゾオキサゾール基への置換基導入による阻害活性の上昇により、全体として化合物の化学的な安定性及び阻害活性の増強がはかれると考え、研究を開始した。またその構造的特徴として、1) カルボニル活性基を持つ、2) HNEのS1, S2, S3等と相互作用する部位を持つ、3) 水溶性向上のための構造（水溶性基部分）を持つ化合物の探索を行った。（**Fig. 2-2**）

また*in vitro*試験に用いたHNE阻害活性試験と*in vivo*試験に用いたHNE誘発肺障害試験の詳細については第2章実験の部で述べる。

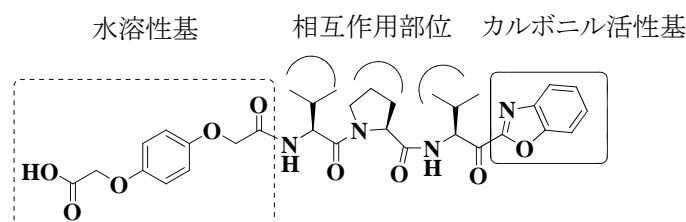
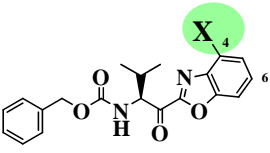


Fig. 2-2 探索化合物の構造的特徴

2-2. 置換基効果とペプチド鎖の短縮

カルボニル活性化部位であるベンゾオキサゾール基への置換基導入効果を確認するために、HNE阻害に必須なP1サイトと相互作用するValのみを残して単純化した化合物**31a**のベンゾオキサゾール4位を中心として種々の置換基を導入した結果、ピバロイルエステル基（化合物**31c**）およびイソペンチルエーテル基（化合物**31g**）に*in vitro*阻害活性が見られた。（**Table 2-1**）これらの基を6位に導入した化合物では*in vitro*阻害活性が見られなかったことから、これらの置換基はHNEのS1'と相互作用していると考えられた。

Table 2-1 ベンゼン環上の置換基効果



Compounds	-X	IC ₅₀ (nM)	Compounds	-X	IC ₅₀ (nM)
31a	-H	>10000	31f	-OCH ₂ CH ₃	>10000
31b	-OH	>10000	31g	-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	780
31c	-OC(=O)C(CH ₃) ₃	450	31h	-OCH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	>10000
31d	-OCH ₂ C ₆ H ₄ CF ₃	>10000	31i	-OCH ₂ CH ₂ CONH ₂	>10000
31e	-OCH ₂ C ₆ H ₅	>10000	31j	-OCH ₂ CH ₂ CO ₂ CH ₃	>10000

一般にペプチド性の化合物は生体内で代謝を受けやすいと考えられることから、相互作用部位のVal-Pro-Valのうち、N末端側のValあるいはVal-Proを省略することにより非ペプチド性の化合物として生体内での安定性を向上させた。そして、HNEのS1'と相互作用していると考えられるピバロイルエステル基とイソペンチル基をベンゾオキサゾール4位に導入し、更に水溶性を向上させるため水溶性基（フェノキシ酢酸）をN末端側に導入した化合物（化合物**32a**～**32d**）を合成し（Table 2-2）、*in vivo*試験としてHNE阻害剤の探索研究に広く一般に用いられているHNE誘発肺障害試験を使用して評価を行った。ハムスター（Syrian, ♂）にHNEを気管支内投与(25 U/site)することにより誘発される肺の出血を、投与後1時間後のBALF中のヘモグロビン量を尺度として測定した。被検化合物はエラスターゼ投与の5分前に単回投与(iv bolus)した。

その結果ペプチド鎖を短縮した化合物（化合物**32b**）は、リード化合物（化合物**32f**）と比較して*in vitro*阻害活性は低下したものの、*in vivo*モデルではほぼ同等の薬効を示した。しかしこれらペプチド鎖を短縮した化合物（化合物**32b**, **32c**, **32d**）では、後肢硬直・血尿および死亡等の重篤な毒性が観察された。ペプチド鎖がVal-Pro-Valである化合物**32e**や**32f**にはこのような毒性が認められないことから、ペプチド鎖を短縮したタイプの化合物の探索は断念した。

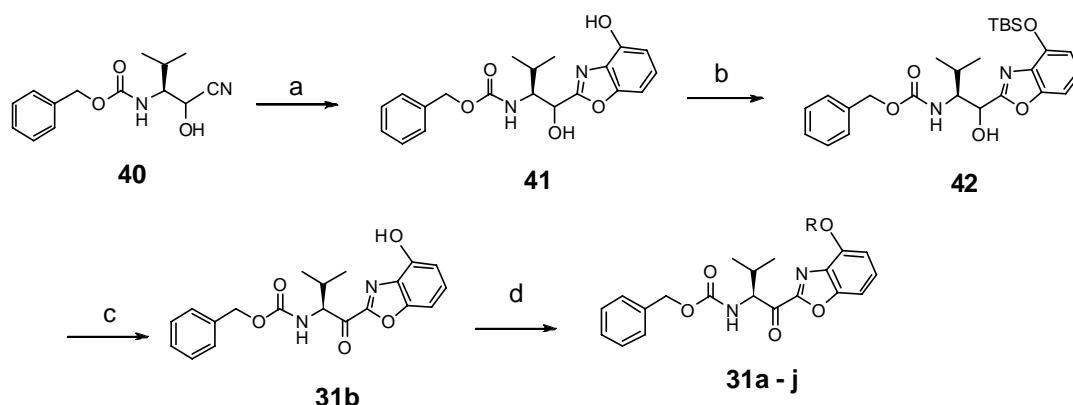
ペプチド鎖がVal-Pro-Valであっても*in vivo*薬効を示すことから、今後の合成展開としてペプチド鎖はVal-Pro-Valに固定し、またこのタイプではベンゾオキサゾール上の置換基効果がみられないことから（化合物**32e** vs. **32f**）、カルボニル活性基を無置換のベンゾオキサゾール基に固定して、水溶性基部分の変換によって*in vivo*薬効の向上を目指すこととした。

Table 2-2 ペプチド鎖の短縮効果

Compounds	-Y-	X-	IC ₅₀ (nM)	Inhibition(%) [*] (mg/kg, iv bolus)	
				100	30
32a	none		130	74	13
32b	Pro		230	96	66
32c	Pro		290	99	0
32d	Pro	HO-	300	91	0
32e	Val-Pro		8.9	99	73
32f	Val-Pro	H-	7.6	98	56

*:HNE誘発肺障害試験

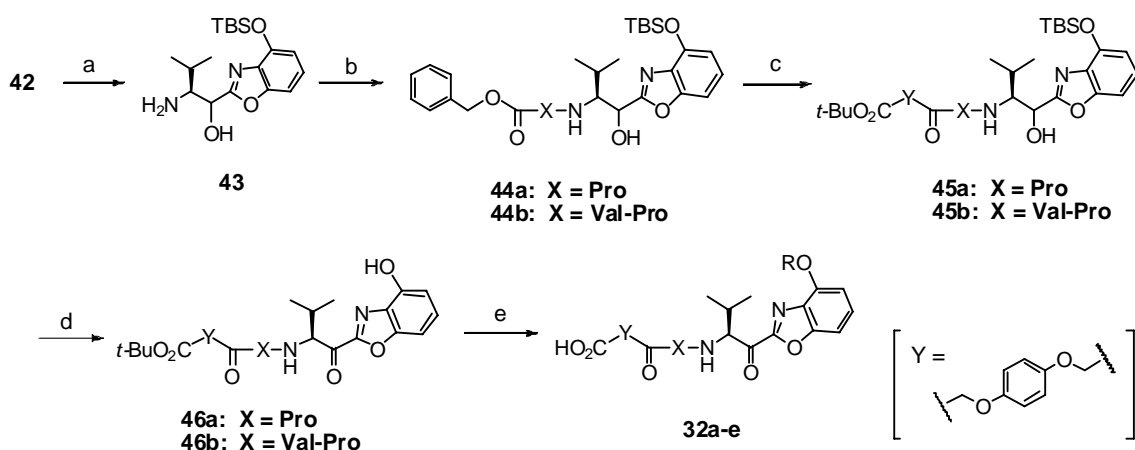
ベンゼン環上の置換基効果の検討を行った化合物**31a-j**は以下に示す合成法に従って合成した。化合物**40**²⁾を出発原料として塩化水素-エタノール処理によるイミデート体を形成した後に、続けて2,6-ジヒドロアニリンと処理することにより化合物**41**を合成した。化合物**41**のフェノール性水酸基をTBS基で保護して化合物**42**とし、DMPによる化合物**42**の2級水酸基の酸化に続きTBS基の脱保護（化合物**31b**）で生じたフェノール性水酸基のアシル化およびアルキル化を行なうことで、目的とする化合物**31c-j**を合成した。尚、化合物**31a**はstep (a) で、2,6-ジヒドロキシアニリンに換えて2-ヒドロキシアニリンを使用することにより合成した。(Scheme 2-1)



Scheme 2-1 ベンゼン環上の置換基効果を検討した化合物の合成

Reagents: (a) (i) HCl, EtOH, CHCl₃; (ii) 2, 6-dihydroxyaniline, Et₃N, EtOH; (b) TBSCl, DMAP, Et₃N, CH₂Cl₂; (c) (i) DMP, *t*-BuOH, CH₂Cl₂; (ii) TBAF, THF; (d) R-Br or R-I, NaH, DMF or RCO₂H, EDC, DMAP, pyridine

次に、ペプチド鎖の短縮効果を検討した化合物**32a-e**は以下に示す合成法に従って合成した。化合物**42**を出発原料として脱Cbz化後、Cbz-Pro-OH（化合物**44a**）またはCbz-Val-Pro-OH（化合物**44b**）と縮合した。再び脱Cbz化後、化合物**35a**と縮合し、化合物**45a,b**を合成した。次にDMPで2級水酸基を酸化後、脱TBS化して化合物**46a,b**とし、フェノール性水酸基のアシル化およびアルキル化を行なった後に脱*t*-エステル化して、目的とする化合物**32a-e**を合成した。（**Scheme 2-2**）



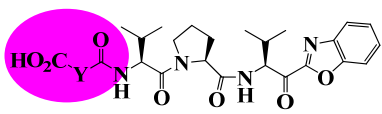
Scheme 2-2 ペプチド鎖短縮化合物の合成

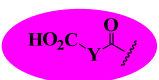
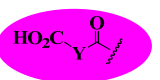
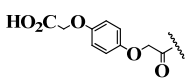
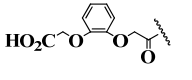
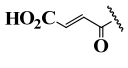
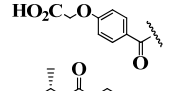
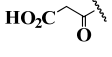
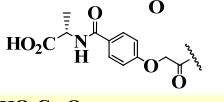
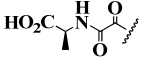
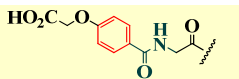
Reagents: (a) H_2 , $Pd(OH)_2$, $AcOEt$; (b) Cbz-Pro-OH or Cbz-Val-Pro-OH, EDC, CH_2Cl_2 ; (c) (i) H_2 , $Pd(OH)_2$, $AcOEt$; (ii) $t-BuO_2C-Y-CO_2H$ (**35a**), EDC, CH_2Cl_2 ; (d) (i) DMP, CH_2Cl_2 ; (ii) TBAF, THF; (e) (i) R-Br or R-I, NaH, DMF or RCO_2H , EDC, DMAP, pyridine; (ii) TFA, CH_2Cl_2

2-3. 水溶性基の検討

ペプチド鎖をVal-Pro-Valに固定し、N末端の水溶性基部分（**Y**）を変換した化合物を合成した。（**Table 2-3**） 先ず、ベンゼン環を脂肪鎖に変換（化合物**32f** vs. **32g-i**）すると*in vitro*阻害活性および*in vivo*薬効の低下がみられた。次にベンゼン環とペプチド鎖の結合部分やカルボン酸残基を変換（化合物**32f** vs. **32j-m**）した化合物を合成したところ、この結合部分にアミド基を挿入した化合物**32m**で*in vitro*阻害活性は低下したが、*in vivo*薬効の向上がみられた。したがって、この水溶性基部分は環状構造やアミド構造を持つ化合物で*in vivo*薬効が向上することが推察された。

Table 2-3 水溶性基の変換1



Compounds		IC ₅₀ (nM)	Inhibition(%) [*] (mg/kg, iv bolus)			Compounds		IC ₅₀ (nM)	Inhibition(%) [*] (mg/kg, iv bolus)		
			100	30	10				100	30	10
32f		7.6	98	56	38	32j		7.2	90	48	37
32g		72	(low solubility)			32k		7.4		60	15
32h		66	—	41	—	32l		5.0	—	63	16
32i		280	—	39	—	32m		33	—	99	46

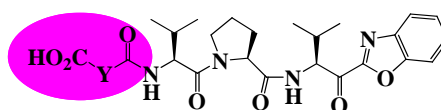
*:HNE誘発肺障害試験

以上の結果より、この水溶性基部分（Y）は環状構造及びアミド官能基両方の存在が活性の向上に好ましいことが推察されたことから、環状構造とアミド官能基の両方を併せ持つ種々の環状アミド化合物を合成した（Table 2-4）。その結果、10 mg/kgの低用量で*in vivo*薬効が60%以上を示す化合物が多数得られた。環状アミド構造は6員環、5員環または飽和環、不飽和環のどちらも有効性を示し、カルボニル基の数、向き、アルキル置換基の有無によって*in vitro*阻害活性はあまり変化がないものの、*in vivo*薬効が大きく変化することがわかった。また水溶性基（Y）をベンゼン環から環状アミド構造にすることで水溶性が飛躍的に向上（pH7での溶解度、化合物32f, 32m : <10 mg/ml, 化合物34a : >100 mg/ml）することにもわかった。

次に*in vivo*試験の投与方法について、10 mg/kgの低用量で*in vivo*薬効が60%以上を示す化合物について、単回投与（iv bolus）と持続投与（iv infusion）の比較を行った。その結果、これら環状アミド構造をもつ化合物は単回投与よりも持続投与の方がより*in vivo*薬効が強くなる傾向がみられ、3 mg/kg/hr, 70 min.の低用量で60%以上の*in vivo*薬効を示す化合物34a, 34l, 34mが得られた。したがってこれら環状アミド構造を有する化合物は、単回投与よりも持続投与の方が適した投与方法であることがわかった。

また、*in vitro*阻害活性と*in vivo*薬効および水溶性の相関について、水溶性基（Y）がベンゼン環と環状アミドの化合物を比較すると、ベンゼン環の化合物では*in vitro*阻害活性は強いが、*in vivo*薬効は弱く、また水への溶解度は低い結果となった。一方、水溶性基（Y）が環状アミドの化合物では*in vitro* IC₅₀値は10⁻⁸ nM程度であるが、*in vivo*薬効が強く、また水への溶解度はpH7で100 mg/ml以上と高い傾向にあった。環状アミドを有する化合物で*in vitro*阻害活性と比較して*in vivo*薬効が向上した理由として、水溶性が高まることにより代謝安定性が改善した結果、*in vivo*薬効が向上したものと推察された。

Table 2-4 水溶性基の変換2



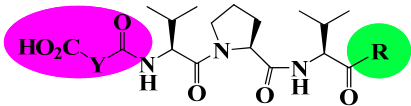
Compounds		IC ₅₀ (nM)	Inhibition(%)* (mg/kg, iv bolus)			Inhibition(%)* (mg/kg/hr, iv infusion)		
			30	10	3	10	3	1
34a		24	97	66	24	93	62	50
34b		27		48				
34c		27	94	47	34			
34d		14	92	70	39	56	38	33
34e		33	—	34	38			
34f		43	—	23	14			
34g		42	91	67	32	78	44	-7
34h		35	81	72	37	53	57	39
34i		47	—	42	40			
34j		23	—	59	20			
34k		17	—	68	22	91	31	25
34l		62	—	67	20	90	73	55
34m		30	—	88	57	95	76	41
34n		62	—	70	44	87	48	34

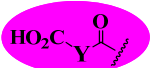

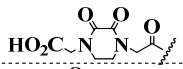
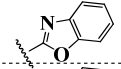
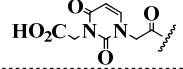
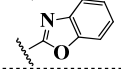
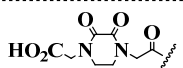
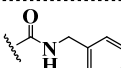
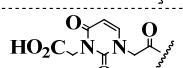
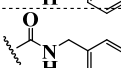
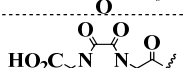
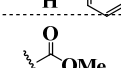
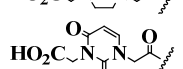
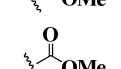
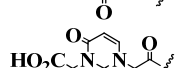

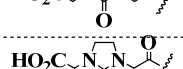
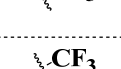
*:HNE誘発肺障害試験

2-4. 水溶性基とカルボニル活性基の最適化

続いて、カルボニル活性基 (**R**) と水溶性基 (**Y**) の最適化を行った (**Table 2-5**)。最適化に用いたカルボニル活性基はベンゾオキサゾール基の他、プロテアーゼ阻害剤で多く使用されているジケトエステル、ジケトアミド、トリフルオロメチル基を選択した。その結果カルボニル活性基によって、最適な水溶性基が異なることがわかった。カルボニル活性基がベンゾオキサゾールやジケトアミドの場合、良好な *in vivo* 薬効を示した (化合物 **34a**, **34p**) ピリミジン酢酸が、トリフルオロメチル基をカルボニル活性基として導入すると *in vivo* 薬効が低下した (化合物 **34s**)。トリフルオロメチル基の水溶性基としてはイミダゾリジノン酢酸 (化合物 **34t**) が最も好適であった。

Table 2-5 カルボニル活性基と水溶性基の最適化



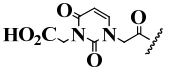
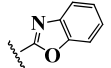
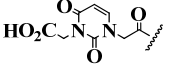
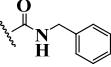
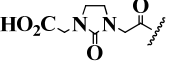



Compounds			IC ₅₀ (nM)	Inhibition(%) [*] (mg/kg, iv bolus)			Inhibition(%) [*] (mg/kg, iv infusion)		
				30	10	3	10	3	1
34m			30	—	88	57	95	76	41
34a			24	97	66	24	93	62	50
34o			20	—	99	70	89	47	31
34p			21	—	77	20	90	78	32
34q			6	—	—	—	94	48	—
34r			7	—	93	61	94	43	32
34s			28	—	68	44	79	8	0
34t (AE-3763)			29	—	96	67	97	84	45

*:HNE誘発肺障害試験

次にそれぞれのカルボニル活性基で強い *in vivo* 薬効を示した化合物 **34a**, **34p**, **34t** を候補化合物として、物性面の比較を行った (**Table 2-6**)。これらの化合物はいずれも活性化されたカルボニル基の α -位に不斉中心を有するため、*in vitro* 阻害活性を示す (*S,S,S*)-isomer から全く阻害活性のない (*S,S,R*)-isomer へと容易に異性化される。したがって異性化を起こしやすい化合物ほど *in vivo* 薬効が減弱しやすいと考えられる。更に活性面だけでなく、保存中に容易に異性化を起こす程安定性に乏しい

次に本研究では、急性期の肺障害に高用量投与可能な注射剤を目指していることから、水に対する溶解度も重要な物性である為、これら3化合物の溶解度(水, PBS at pH7.4)を測定し、比較した。その結果、化合物**34a**, **34p**はpH7.4で>100 mg/mlと十分な溶解度を示したが、更に驚くべきことに化合物**34t**ではすべてのpH(2-11)で>1000 mg/mlと最もすぐれた溶解度を示した。以上の結果から開発候補化合物として化合物**34t**(=AE-3763)を選択した。

			IC ₅₀ (nM)	異性化の 反応速度* Kf (h ⁻¹)	異性化が 起こらない 最大pH* ²	溶解度 (mg/ml)	
						H ₂ O	pH7.4
34a			24	0.107	pH4.0	5.02 (pH2.8)	>100
34p			21	0.023	-	8.66 (pH2.6)	>100
34t (AE-3763)			29	0.012	pH5.5	>1000 (pH2-11)	

尚、Table 2-3, 2-4, 2-5の各化合物の合成はScheme 2-3に示すとおり、市販のmalonic acid *mono-tert-butyl ester*およびFig. 2-3に示す水溶性基のハーフエステル体35a-uと、Fig. 2-4に示すトリペプチド誘導体36a²⁾, 36b³⁾, 36c³⁾, 36d⁴⁾を縮合し、酸化、脱保護工程を経て合成した。

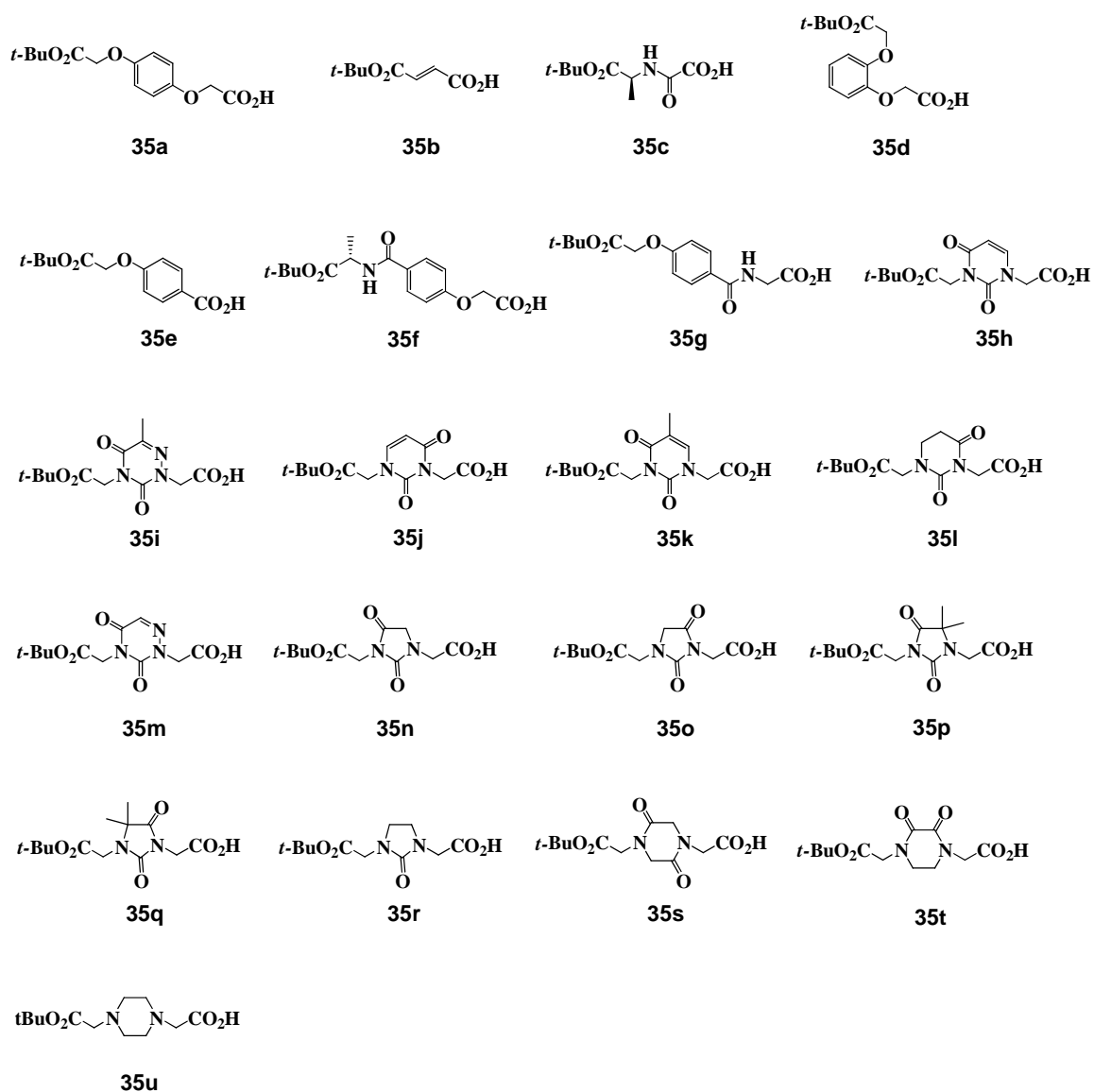


Fig. 2-3 水溶性基のハーフエステル体

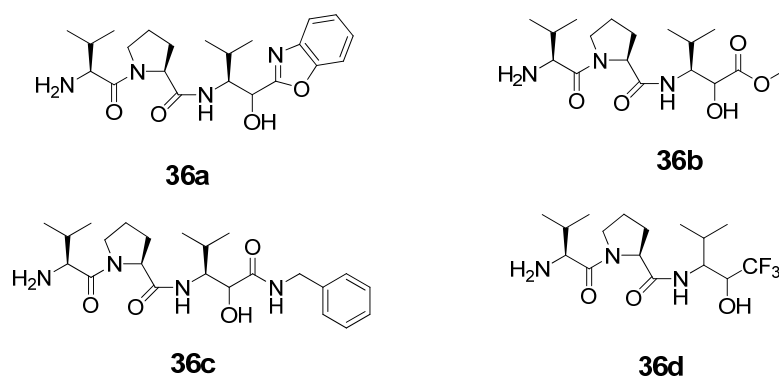
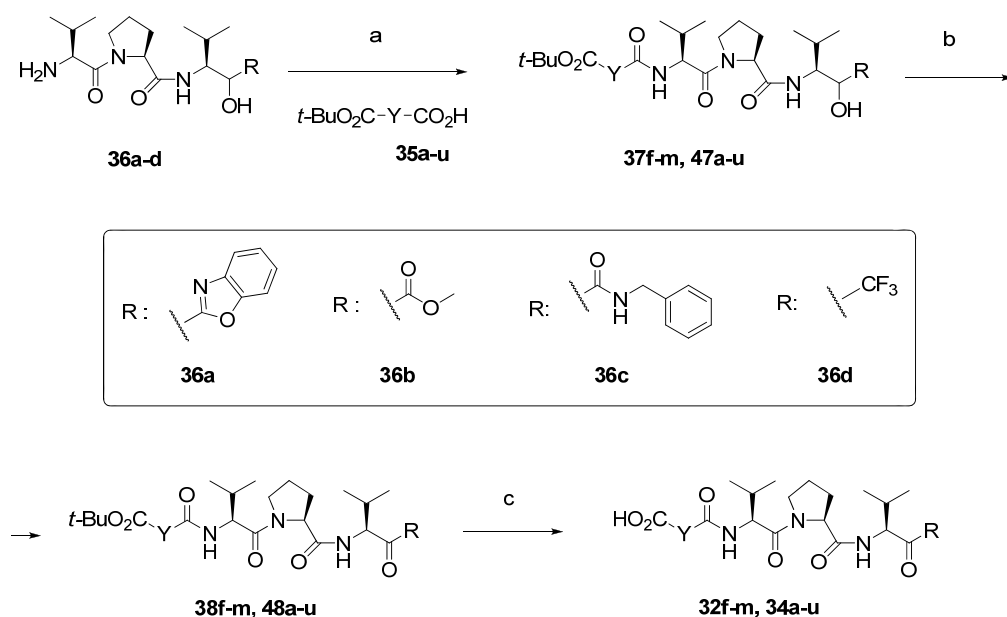


Fig. 2-4 トリペプチド誘導体



Scheme 2-3 トリペプチド誘導体の合成

Reagents: (a) EDC, pyridine; (b) DMP, CH_2Cl_2 ; (c) TFA, CH_2Cl_2

2-5. **AE-3763**の薬効薬理・毒性の高次評価について

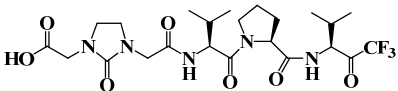
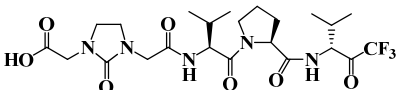
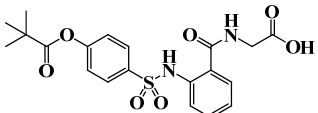
これまで説明したように、HNEは非常に多岐にわたる臓器障害に関与していることが知られており、その阻害剤はこの臓器障害の有望な治療薬となり得ると考えられる。本研究では、とりわけ急性期の臓器障害時に高用量投与可能な高水溶性および低毒性注射剤の開発を目的として探索研究を行った結果、それらを十分満足させる候補化合物として**AE-3763**を見出した。そこでこの化合物が臨床開発化合物として選択できるかどうかを評価することを目的として、より高次の薬効薬理評価、毒性試験を行った。

まず、HNEに対する**AE-3763**とその異性体**34u**および世界で唯一上市されているSivelestatの阻害活性を合成基質 (Suc(OMe)-AAPV-pNA) と天然基質エラスチンを用いて比較した (**Table 2-7**)。その結果、合成基質を用いた場合の**AE-3763**の IC_{50} 値はほぼ同程度であったが、エラスチンを基質として用いた場合には**AE-3763**の方が25倍強い阻害活性を示した。尚、**AE-3763**の異性体**34u**は*in vitro*阻害活性を全く示さなかった。更に**AE-3763**のカルボニル基が還元されたアルコール体も同様に*in vitro*阻害活性を全く示さなかった。

次にHNEに対する**AE-3763**の阻害様式を酵素反応速度論的方法によって解析した。**AE-3763**の種々濃度における阻害曲線はCompetitive Slow Binding Inhibition型の理論式によく合致し、その阻害定数 K_i 値は3.2 nMであった。また、**AE-3763**による阻害が可逆的か否かを試験した。大過剰の**AE-3763**で阻害したHNE液を1万倍に希釈し、希釈液の酵素活性を測定した。その結果、希釈処理によって酵素阻害は解

除され、時間とともに酵素活性は回復した。このことから、本阻害が可逆的であることが確認された。ハムスター、ラットおよびウサギ由来の好中球エラスターゼ（NE）に対する**AE-3763**の阻害活性も測定したが、これら動物由来のNE阻害感受性に対して大きな差はみられなかった（human IC₅₀: 39 nM; hamster IC₅₀: 93 nM; rat IC₅₀: 78 nM; rabbit IC₅₀: 101 nM）。

Table 2-7 **AE-3763**, Sivelestatおよび異性体**34u**のHNEに対する阻害作用

Compounds	Structure	Suc(OMe)-AAPV-pNA hydrolysis		Elastin degradation
		K _i (nM)	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
AE-3763 (34t)		3.2	39	240
34u		Not active	>10000	Not determined
Sivelestat		17	29	6100

次に代表的な各種プロテアーゼに対する**AE-3763**の阻害活性について検討した。（**Table 2-8**）その結果、膵エラスターゼに対し弱い阻害活性を示したがその他の酵素に対して阻害活性を示さなかった。

Table 2-8 AE-3763の各種酵素に対する阻害活性

Enzyme	Source	IC ₅₀ (nM)
Serine proteases		
Neutrophil elastase	human	39
Pancreatic Elastase	porcine	2100
Chymotrypsin	porcine	>10000
Cathepsin G	human	>10000
Trypsin	human	>10000
Thrombin	human	>10000
Plasmin	human	>10000
Metalloproteases		
Thermolysin	<i>B. thermoproteolyticus</i>	>10000
<i>P. aeruginosa</i> Elastase	<i>P. aeruginosa</i>	
Matrix metalloproteinase-8	human	>10000
Matrix metalloproteinase-9	human	>10000
Cysteine proteases		
Cathepsin B	human	>10000
Cathepsin B	human	>10000
Aspartic proteases		
Cathepsin D	bovine	>10000
Pepsin	porcine	>10000
Hydrolytic enzymes		
Phospholipase A ₂	porcine	>10000
Phospholipase A ₂	<i>Crotalus atrox</i>	>10000
Acetylcholinesterase	<i>Bacillus cereus</i>	>10000
Butyrylcholinesterase	horse	>10000

次に、*in vivo*スクリーニング試験に用いたHNE誘発肺障害試験における有効性の詳細な検討を行った。ハムスター（Syrian, ♂, 7～8week）にHNEを気管支内投与することにより、1時間後に顕著な肺出血が認められた。AE-3763(0.1～10 mg/kg/hr)をHNE投与の10分前から70分間静脈内に持続投与することにより、肺出血は用量依存的に抑制され、そのED₅₀値は0.43 mg/kg/hrであった（Fig. 2-5）。一方、Sivelestat (10～100 mg/kg/hr)も肺出血抑制作用がみられたが、そのED₅₀値は73 mg/kg/hrと弱いものであった。更に、HNE誘発肺出血はAE-3763(0.1～10 mg/kg/hr)をHNE投与の5分前に静脈内急速投与することによっても用量依存的に抑制され、そのED₅₀値は1.2 mg/kg/hrであった（Fig. 2-6）。

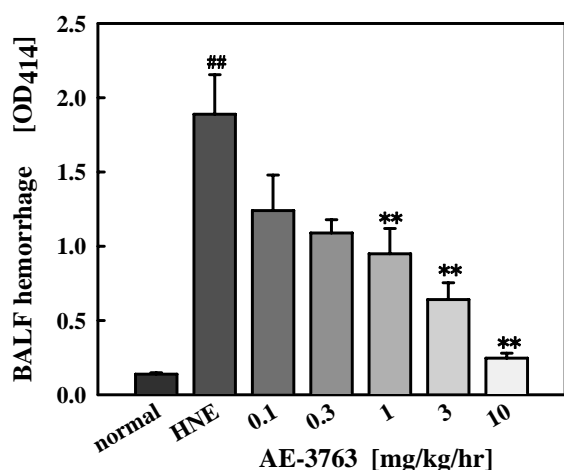


Fig. 2-5 HNE誘発肺障害抑制効果 (iv infusion)

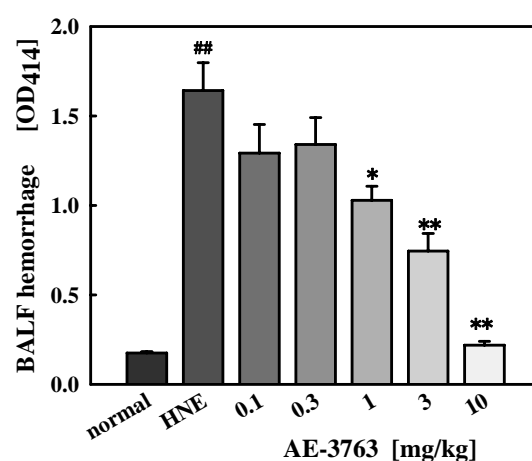


Fig. 2-6 HNE誘発肺障害抑制効果 (iv volus)

・各点は平均値±標準誤差(n=8)

・正常群対照群に対して##:p<0.01 (Student's t-test), HNE投与群に対して*:p<0.05, **:p<0.01 ((Dunett's test))

次に、HNE誘発肺障害試験以外でALI/ARDSの病態をあらわす動物モデルとして知られている、LPS誘発肺障害モデルにおける有効性を確認した。ALI/ARDSとこのモデルではtime courseが異なるが、好中球の浸潤やHNEの遊離、浮腫の形成など種々の傷害がALIと類似していることから、ある程度病態を反映しているモデルであると考えられる。

ハムスター(Syrian, ♂, 7~8week)にLPSを気管支内投与することにより、6時間後に顕著な肺浮腫が認められた。LPS投与時から6時間 **AE-3763**(0.75~6 mg/kg/hr)を静脈内持続投与(iv infusion)することにより、肺浮腫は3.0 mg/kg/hrより有意に、用量依存的に抑制された (**Fig. 2-7**)。Sivelestat (1.5~50 mg/kg/hr)も有意に肺浮腫を抑制したが、最小有効量は15 mg/kg/hrであった。

ハムスター(Syrian, ♂, 7~8 week)にLPSを気管支内投与することにより、6時間後に回収したBALF中の白血球数が顕著に上昇した。LPS投与時から6時間、**AE-3763** (0.75~6 mg/kg/hr)を静脈内持続投与(iv infusion)することにより、BALF中への白血球の浸潤は1.5 mg/kg/hrより有意に、用量依存的に抑制された (**Fig. 2-8**)。Sivelestat (1.5~50 mg/kg/hr)も有意に白血球の浸潤を抑制したが、最小有効量は50 mg/kg/hrであった。

更にAE-3763の治療効果を確認するために、LPSによる肺障害を発症した後にAE-3763を投与する試験も行った。初回のLPS投与24時間後に肺障害が発症していることを確認後、更に追加のLPS投与を行うと、48時間後まで肺障害が遷延することが示された。この際AE-3763 (10 mg/kg/hr)を初回のLPS投与後24時間から静脈内持続投与を開始すると、BALF中の白血球浸潤、エラスターゼ活性、総蛋白濃度の有意な抑制が認められた。したがって、AE-3763は病態発症後の投与でも有効であることが示された⁵⁾。

Lung edema

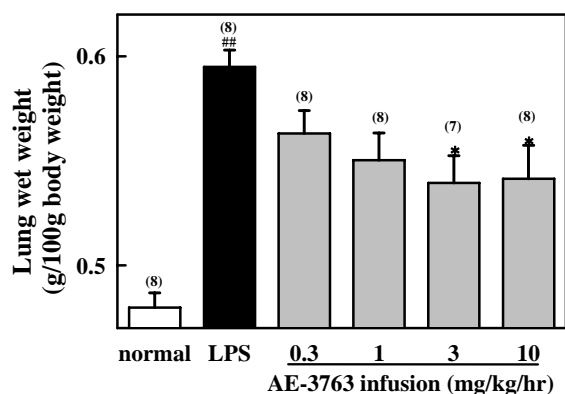


Fig. 2-7 LPS誘発肺浮腫に対する抑制効果

Infiltration of leukocytes into the lung

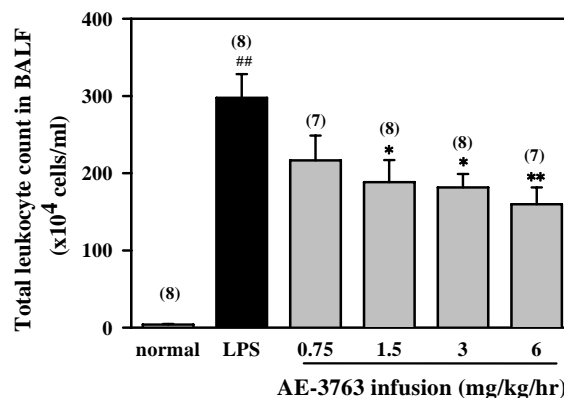


Fig. 2-8 LPS誘発白血球浸潤に対する抑制効果

・各点は平均値±標準誤差(n=8)

・正常群対照群に対して^{##}:p<0.01 (Student's t-test), LPS投与群に対して*:p<0.05, **:p<0.01 ((Dunett's test))

次に多臓器障害マウスの生存率に対する**AE-3763**の改善効果を検討した。マウス(C3H/HeN, ♂, 6~7 week)にLPSおよびガラクトサミンを静脈内投与することにより、6時間後より死亡例が認められ、24時間後には20例中15例が死亡した。**AE-3763**はLPS/ガラクトサミン投与時から10時間後まで2時間毎に計6回、マウスでは技術的な問題で静脈内持続投与ができないため、腹腔内投与で行った。10 mg/kg×6回投与群では24時間後に20例中12例が死亡し、有意差は認められなかったが、100 mg/kg×6回投与群では24時間後に20例中6例の死亡にとどまり、有意な死亡率改善が認められた。また最終観察時まで生存していたマウス肝臓の障害をGPT活性で評価すると、**AE-3763**投与群では著しい障害の軽減が認められた。したがって、**AE-3763**による生存率の改善は、最大の死亡原因となる肝臓の障害・機能不全を大きく軽減した結果であると推察される (Fig. 2-9)。

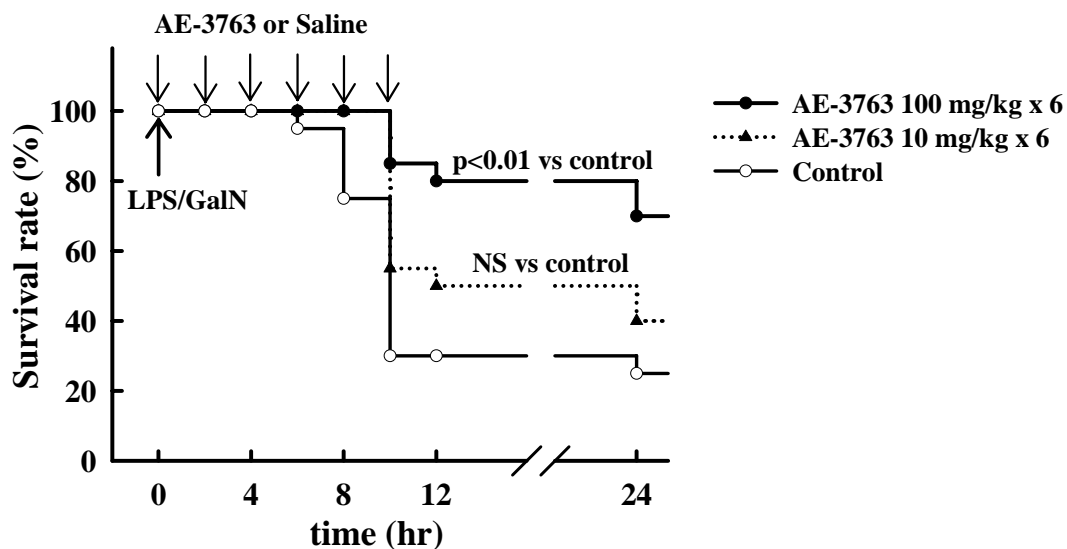


Fig. 2-9 多臓器障害マウスの生存率に対する改善効果

最後に安全性面の検討を行った。ラットに2000 mg/kgまでの用量を、イヌに500 mg/kgまでの用量を単回投与(iv bolus)あるいは、ラットおよびイヌに2000 mg/kg/dayの用量を24時間持続投与(iv infusion)したが、ラット、イヌともにいずれの投与方法でも死亡動物は認められなかった。したがって、24時間持続投与(iv infusion)の条件下で**AE-3763**の致死量はラット、イヌで雌雄ともに2000 mg/kg/day以上と推定された。

次にラット、イヌを用いて4週間持続投与(iv infusion)による亜急性毒性試験を実施した。ラットに200, 600, 2000 mg/kg/dayの用量を4週間持続静脈内投与(iv infusion)したが、すべての検査項目において**AE-3763**投与の影響はみられなかった。したがってラットにおける無毒性量(NOEL)は2000 mg/kg/day以上と推定された。イヌに200, 600, 2000 mg/kg/dayの用量を4週間持続静脈内投与(iv infusion)したが、2000 mg/kg/dayで投与による影響が、および600 mg/kg/dayの用量で投与部位への刺激性が認められた。したがってイヌにおける無毒性量 (NOEL) は200 mg/kg/dayと推定された。

以上の結果より、**AE-3763**は既存のHNE阻害剤と比較して、良好な物性、有効性、安全性を兼ね揃えていることから、開発化合物として選択した。また本化合物は、水に対する溶解性も既存のHNE阻害剤に比べて著しく高く、高用量での投与も可能であり、急性期の救命を目的とした注射用治療薬として非常に期待される。

2-6. 考察ならびに小括

これまで説明したとおり、本研究ではHNEが関与する臓器障害の治療薬、とりわけ急性期に使用可能な注射剤の開発を目的として、HNE特異的阻害剤の探索研究を開始した。ベンゾオキサゾール誘導体をプロトタイプとして検討を重ねて、目標とする薬効を示す化合物群を見出した。これらの化合物について高次薬効評価、毒性試験、物性、合成面から絞り込みを行い、*in vivo*薬効が強く、また水溶性の高い**AE-3763**を見出した。本化合物は、遷移状態安定化メカニズムによるHNE阻害剤として一般に知られている基本骨格 (**R-Val-Pro-Val-CF₃**) の**R**基へ、水溶性に非常に優れた効果を発揮するカルボキシメチルイミダゾリジノン基を導入した構造特徴とするものである。

一般にHNEは疎水性基を好むプロテアーゼであって、**R**部分は疎水性を好む**S4**に近いことから疎水性である必要があり、親水性基の導入は困難と考えられてきた。そこで**R**部分をベンゼン環とし、注射剤とするためHNEの疎水性を好む**S4**から離れた部分に酸性残基を導入して水溶性を向上させた阻害剤の探索研究を行った。その研究の中で、この**R**部分がベンゼン環のような環状構造およびアミド構造を有し、かつ末端にカルボン酸残基を有する化合物で*in vivo*薬効の向上がみられたことから、HNEの**S4**部分と環状構造部分との相互作用や、HNEのArg等の塩基性残基とカルボン酸残基との相互作用を期待して種々の環状アミド構造をもつ化合物を合

成した。その結果、置換基やカルボニル基の位置、不飽和環や飽和環等の変換等で阻害活性に変化がみられたものの、置換基、カルボニル基や不飽和結合のないピペリジン構造でも同等のHNE阻害活性がみられたことから、このR部分はHNEのS4と相互作用しているわけではなく、末端のカルボン酸残基をHNEの親水性基を許容する部分へと誘導する役割があると推定された。そこでその推論を確認するため、HNEと**AE-3763**の複合体の結晶を作製しX線結晶構造解析⁶⁾を行っていただいた (**Fig. 2-10**)。その結果、**AE-3763**はトリフルオロメチルケトン部分でSer-195O γ と共有結合を形成し、四面体構造をとっていた。ケトン酸素原子はオキシアニオンホール Ser-193NH、Ser-195NHと水素結合を形成していた。**AE-3763**のP1-Val側鎖はHNE S1部位と疎水結合をしていた。また、P1-ValNH、P3-ValCO、P3-ValNHはそれぞれHNEのSer-214CO、Val-216NH、Val-216COと水素結合を形成していた。P4部分のイミダゾリジノンはHNEのS4と相互作用しておらず溶媒領域側に露出していた (**Fig. 2-11**)。以上の結果から、環状アミド構造は、親水性の高いカルボン酸残基を、疎水性を好むHNEの内部から溶媒領域へと押し出すことによって、HNE阻害活性発現に重要な他の相互作用がより強固になり、阻害活性の向上に寄与していることが示唆された。

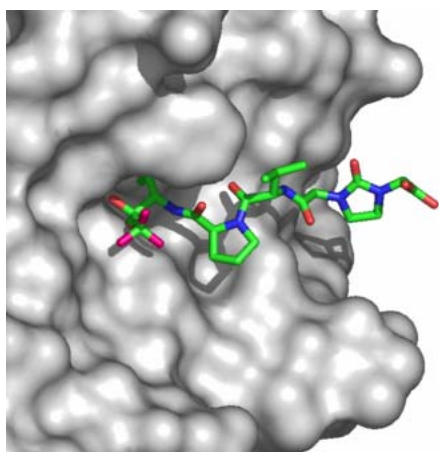


Fig. 2-10 HNEと**AE-3763**のX線結晶解析⁶⁾

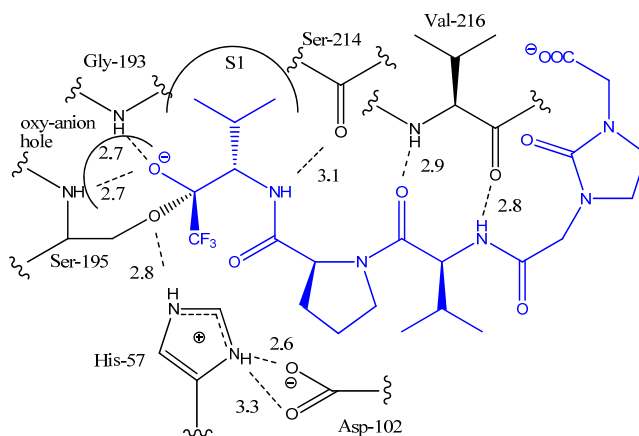


Fig. 2-11 HNEと**AE-3763**の結合様式図⁶⁾

AE-3763の物性、薬効、安全性について以下にまとめる。

< 物性 >

- ・ 酢酸エチル、メチルエチルケトン、アセトン等から晶出可能。
- ・ 水に対する溶解度は>1000 mg/ml (pH2-11)
- ・ 異性化反応速度は、溶液のpHに依存し、アルカリ性で早く、中性、および酸性溶液中では安定であった。またpH5.5以下の酸性溶液中では異性化しなかった。(25°C /24時間)
- ・ 37°C/pH7.4での異性化反応定数はKf(h⁻¹)=0.012であった。

<薬効>

- ・ HNEに対して選択的に阻害活性を示した。(IC₅₀値：39 nM, K_i値：3 nM) その阻害様式は競合的、かつ可逆的であった。
- ・ 静脈内投与により、ハムスターのHNE誘発肺障害を抑制した。ED₅₀値は値は持続投与(iv infusion)で0.43 mg/kg/hr, 70 min.であった。一方、単回投与(iv bolus)では1.2 mg/kg/hr, 70 min.であった。
- ・ 静脈内投与により、ハムスターのLPS誘発肺障害を抑制した。LPS誘発肺浮腫に対して最小有効量は3.0 mg/kg/hr, 6 hr, iv infusionであった。LPS誘発白血球浸潤に対して最小有効量は1.5 mg/kg/hr, 6 hr, iv infusionであった。
- ・ 多臓器障害マウスで、100 mg/kg×6回投与群では24時間後の有意な死亡率改善が認められた。

<安全性>

- ・ マウスおよびイヌに対する致死量は雌雄ともに2000 mg/kg/day, iv以上と推定された。
- ・ ラット、イヌを用いた4週間持続静脈内投与(iv infusion)試験の結果、ラットでの最大無作用量(NOAE)は2000 mg/kg/day, iv、イヌでは200 mg/kg/day, ivと推定された。

2-7. 実験の部

2-7-1. Chemistry

合成における各種物性データの測定機器、測定方法および物性データの表記法を以下に示した。

融点はThomas Hooverキャピラリー融点測定器を用いて測定し、未補正である。

¹H核磁気共鳴(NMR)スペクトルは、JEOL JNM LA-300 (300 MHz)、JEOL JNM LA-400 (400 MHz)またはVarian Gemini-200 (200 MHz)を用いて室温で測定した。化学シフトはテトラメチルシラン (TMS)を内部標準としてδ値 (ppm)で表示した。いずれもシグナルの分裂様式は、s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broadなどの略号を用いて表した。

質量分析スペクトル(MS)は、Hitachi M-1000 (APCI)あるいは Hitachi M-80-B (LSI)を用いて測定した。高分解能質量分析スペクトル (HRMS)は、LTQ Orbitrap Discovery (ESI)を用いて測定した。比旋光度は、Jasco P-1020を用いて測定した。

薄層クロマトグラフィー(TLC)にはMerk Kieselgel 60 F254 precoated platesを用いた。カラムクロマトグラフィーにはMerk Kieselgel 60 (順層) あるいは Mitsubishi-kasei CHP-20P (逆相) を用いた。

2-7-2. 2-2 に関する実験

2-7-2-1 化合物 **31a-j** の合成

Benzyl (2S)-1-hydroxy-1-(4-hydroxybenzo[d]oxazol-2-yl)-3-methylbutan-2-yl carbamate (41)

クロロホルム (80 ml) とエタノール (80 ml) の混合溶液に氷冷下で、AcCl (89.4 g) を 30 分かけて滴下し、続けて同温で Cbz-valinal cyanohydrin²⁾ (**40**, 10.0 g) とクロロホルム (80 ml) の混合溶液を加え、0°C で 1 時間攪拌した。反応混合物を 25°C 以下でそのまま減圧濃縮した。濃縮残渣にエタノール (200 ml) を加えて攪拌し、室温で 2, 6-ジヒドロキシアニリン (6.77 g) と Et₃N (4.24 g) を加えて、終夜加熱還流した。反応液を室温になるまで放冷した後に、水中にわけ酢酸エチルで抽出した。有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄ 乾燥して減圧濃縮した。濃縮残渣にメタノール (100 ml) および活性炭を加え、30 分攪拌後に活性炭を濾過し、濾液を減圧濃縮して目的物 **41** (11.6 g, 82%) を無色油状物として得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.83-0.97 (6H, m), 1.70 (0.7H, m), 2.18 (0.3H, m), 3.77 (0.7H, ddd), 4.03 (0.3H, ddd), 4.64-5.00 (3H, m), 5.91 (0.7H, d), 6.13 (0.3H, d), 6.72 (0.7H, dd), 6.76 (0.3H, dd), 7.00-7.36 (8H, m), 10.2 (0.3H, s), 10.5 (0.7H, s); MS (LSI, positive) *m/z* 371 [(M+H)⁺].

Benzyl (2S)-1-[4-(*tert*-butyldimethylsilyloxy)benzo[d]oxazol-2-yl]-1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl carbamate (42)

化合物 **41** (4.4 g) のジクロロメタン (80 ml) 溶液に、室温で DMAP (70mg) および Et₃N (2.4 g) を加え、氷浴中において *t*-ブチルジメチルシリルクロリド (3.5 g) を加え、室温において 1 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄ 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=5:1→4:1) で精製し、目的物 **42** (4.6 g, 81%) を無色油状物として得た。

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃, δ) 0.22 (4.2H, s), 0.24 (1.8H, s), 0.93-1.13 (15H, m), 1.69-2.12 (1H, m), 3.31-4.08 (2H, m), 4.87-5.85 (4H, m), 6.80 (1H, m), 7.12-7.37 (8H, m); MS (APCI, positive) *m/z* 485 [(M+H)⁺].

(S)-Benzyl 1-(4-hydroxybenzo[d]oxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl carbamate (31b)

化合物 **42** (4.6 g) のジクロロメタン (50 ml) 溶液に、室温で *t*-ブチルアルコール (0.7 g) および DMP (12.6 g) を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム溶液／飽和チオ硫酸ナトリウム溶液中にわけ酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液／飽和チオ硫酸ナトリウム溶液、飽和炭酸水素

ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。濃縮残渣をテトラヒドロフラン (100 ml)に溶解させ、室温で 1Mテトラブチルアンモニウムフロリド テトラヒドロフラン溶液 (19 ml)を加えて、室温で 30 分攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=4:1→2:1)で精製して、目的物 **31b** (2.9 g, 83%)を無色結晶として得た。

Mp 120-122°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.92 (3H, s), 0.98 (3H, s), 2.38 (1H, m), 5.02 (2H, s), 5.17 (1H, dd), 6.88 (1H, d), 7.09-7.47 (8H, m), 10.9 (1H, s); MS (APCI, positive) m/z 369 [(M+H)⁺].

(S)-2-[2-(Benzyloxycarbonylamino)-3-methylbutanoyl]benzo[d]oxazol-4-yl pivalate (31c)

化合物 **31b** (100 mg)のピリジン (5 ml)溶液に、室温でピバル酸 (55 mg)、EDC (103 mg)およびDMAP (3 mg)を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を水中にあげ酢酸エチルで抽出し、有機層を 1 M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮し、目的物 **31c** (123 mg, quant.)を無色油状物として得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.89 (3H, s), 0.97 (3H, s), 1.42 (9H, s), 2.38 (1H, m), 5.03 (2H, s), 5.12 (1H, dd), 7.30-7.92 (9H, m); MS (APCI, positive) m/z 453 [(M+H)⁺].

化合物 **31c** の合成と同様に反応を行い、以下の化合物を合成した。

(S)-Benzyl 1-(benzo[d]oxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylcarbamate (31a)

300 mg (colorless oil, 59% from **40**); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.92 (3H, s), 0.98 (3H, s), 2.42 (1H, m), 5.03 (2H, s), 5.15 (1H, dd), 7.30-8.10 (10H, m); MS (APCI, positive) m/z 353 [(M+H)⁺].

(S)-Benzyl 3-methyl-1-oxo-1-[4-(3-(trifluoromethyl)benzyloxy)benzo[d]oxazol-2-yl]-butan-2-ylcarbamate (31d)

138 mg (crystalline powder, 49%); Mp 132-133°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.90 (3H, s), 0.96 (3H, s), 2.36 (1H, m), 5.02 (2H, s), 5.11 (1H, dd), 5.55 (2H, s), 7.17 (1H, dd) 7.33-7.95 (12H, m); MS (APCI, positive) m/z 527 [(M+H)⁺].

(S)-Benzyl 1-[4-(benzyloxy)benzo[d]oxazol-2-yl]-3-methyl-1-oxobutan-2-yl carbamate (31e)

100 mg (crystalline powder, 40%); Mp 114-116°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.90 (3H, s), 0.97 (3H, s), 2.36 (1H, m), 5.02 (2H, s), 5.10 (1H, dd), 5.42 (2H, s), 7.15 (1H, dd) 7.33-7.95 (12H, m), 7.94 (1H, d); MS (APCI, positive) m/z 459 [(M+H)⁺].

(S)-Benzyl 1-(4-ethoxybenzo[d]oxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-ylcarbamate (31f)

106 mg (crystalline powder, 50%); Mp 115-117°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.90 (3H, s), 0.97 (3H, s), 1.45 (3H, t), 2.37 (1H, m), 4.43 (2H, q), 5.02 (2H, s), 5.13 (1H, dd), 5.42 (2H, s), 7.03-7.60 (8H, m), 7.94 (1H, d); MS (APCI, positive) *m/z* 397 [(M+H)⁺].

(S)-Benzyl 1-[4-(isopentyloxy)benzo[d]oxazol-2-yl]-3-methyl-1-oxobutan-2-ylcarbamate (31g)

115 mg (crystalline powder, 49%); Mp 75-77°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.87-0.98 (12H, m), 1.75 (2H, m), 1.83 (1H, m), 2.37 (1H, m), 4.33 (2H, t), 5.03 (2H, s), 5.14 (1H, dd), 7.06-7.60 (8H, m), 7.92 (1H, d); MS (APCI, positive) *m/z* 439 [(M+H)⁺].

(S)-Benzyl 3-methyl-1-oxo-1-[4-(pentyloxy)benzo[d]oxazol-2-yl]butan-2-ylcarbamate (31h)

157 mg (crystalline powder, 66%); Mp 82-83°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.87-0.98 (9H, m), 1.30-1.52 (4H, m), 1.83 (2H, m), 2.37 (1H, m), 4.30 (2H, t), 5.03 (2H, s), 5.13 (1H, dd), 7.03-7.60 (8H, m), 7.92 (1H, d); MS (APCI, positive) *m/z* 439 [(M+H)⁺].

(S)-Benzyl 1-[4-(2-amino-2-oxoethoxy)benzo[d]oxazol-2-yl]-3-methyl-1-oxobutan-2-ylcarbamate (31i)

136 mg (crystalline powder, 59%); Mp 150-151°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.92 (3H, s), 0.99 (3H, s), 2.41 (1H, m), 4.80 (2H, s), 5.03 (2H, s), 5.14 (1H, dd), 6.95-7.61 (10H, m), 7.92 (1H, d); MS (APCI, positive) *m/z* 426 [(M+H)⁺].

(S)-Methyl 2-{2-[2-(benzyloxycarbonylamino)-3-methylbutanoyl]benzo[d]oxazol-4-yloxy}acetate (31j)

100 mg (crystalline powder, 42%); Mp 102-103°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.89 (3H, s), 0.98 (3H, s), 2.38 (1H, m), 3.72 (3H, s), 5.03 (2H, s), 5.13 (1H, dd), 5.17 (2H, s), 7.01-7.60 (8H, m), 7.93 (1H, d); MS (APCI, positive) *m/z* 441 [(M+H)⁺].

2-7-2-2 化合物 32a-eの合成

(2S)-2-Amino-1-(4-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy]-1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methylbutan-1-ol (43)

化合物 42 (11 g) の酢酸エチル (150 ml) 溶液に、室温で触媒量の 20% Pd(OH)₂-C を加え、水素気流下 1 時間攪拌した。反応液を濾過後、濾液を減圧濃縮し、目的物 43 (7.5 g) を無色油状物として得た。この化合物はこれ以上精製することなく、

次の反応に使用した。

MS (APCI, positive) m/z 351 $[(M+H)^+]$.

Benzyl (2*S*)-2-[[*(2S)*-1-(4-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy)-1,3-benzoxazol-2-yl]-1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl]carbamoyl]pyrrolidine-1-carboxylate (44a)

化合物 **43** (7.5 g) のジクロロメタン (100 ml) 溶液に、室温でEDC (4.9 g) および Cbz-Pro (5.3 g) を加え、室温において終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄ 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=2:1→1:1) で精製し、目的物 **44a** (9.6 g, 77%) を foam として得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.23 (3H, s), 0.25 (3H, s), 0.65-2.40 (20H, m), 3.23 (2H, m), 3.85-5.08 (5H, m), 6.00 (0.5H, m), 6.18 (0.5H, d), 6.80 (1H, m), 7.17-7.87 (8H, m); MS (APCI, positive) m/z 582 $[(M+H)^+]$.

***tert*-Butyl (4-{2-[[*(2S)*-2-[[*(2S)*-1-(4-[[*tert*-butyl(dimethyl)silyl]oxy)-1,3-benzoxazol-2-yl]-1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl]carbamoyl]pyrrolidin-1-yl]-2-oxoethoxy} phenoxy)acetate (45a)**

化合物 **44a** (9.6 g) の酢酸エチル (100 ml) 溶液に、室温で触媒量の 20% Pd(OH)₂-C を加え、水素気流下 1 時間攪拌した。反応液を濾過後、濾液を減圧濃縮して濃縮残渣 (7.5 g) を得た。この濃縮残渣 (3.5 g) のジクロロメタン (50 ml) 溶液に、室温でEDC (1.65 g) および **35a** (2.3 g) を加え、室温において終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄ 乾燥して減圧濃縮し、目的物 **45a** (5.3 g) を foam として得た。この化合物はこれ以上精製することなく、次の反応に使用した。

MS (LSI, positive) m/z 712 $[(M+H)^+]$.

1-[[4-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethoxy)phenoxy]acetyl]-*N*-[[*(2S)*-1-(4-hydroxy-1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (46a)

化合物 **45a** (5.3 g) のジクロロメタン (50 ml) 溶液に、室温で *t*-ブチルアルコール (0.55 g) および DMP (9.8 g) を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム溶液／飽和チオ硫酸ナトリウム溶液中にあげ酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液／飽和チオ硫酸ナトリウム溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄ 乾燥して減圧濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラム (SiO₂ 100g, ヘキサン:酢酸エチル=1:1) で精製して、中間体 (4.7 g) を得た。得られた中間体 (4.6 g) にテトラヒドロフラン (50 ml) を加えた後、室温で 1M テトラブチルアンモニウムフロリド テトラヒドロフラン溶液 (13 ml)

を加えて、室温で 15 分攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラム (クロロホルム:アセトニトリル=4:1)で精製して、目的物 **46a** (3.8 g, 84%)を foam として得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.87-1.04 (6H, m), 1.48 (9H, s), 1.78-2.49 (5H, m), 3.42-3.66 (2H, m), 4.52-4.80 (5H, m), 5.35 (1H, dd), 6.76-6.95 (5H, m), 7.27 (1H, dd), 7.45 (1H, dd), 8.43 (1H, d), 10.9 (1H, s); MS (LSI, positive) *m/z* 596 [(M+H)⁺].

1-[[4-(Carboxymethoxy)phenoxy]acetyl]-*N*-[(2*S*)-1-{4-[(2,2-dimethylpropanoyl)oxy]-1,3-benzoxazol-2-yl}-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (32b)

化合物 **46a** (1.0 g)のピリジン (20 ml)溶液に、室温でピバル酸 (0.34 g)、EDC (0.64 g)およびDMAP (20 mg)を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を水中にわけ酢酸エチルで抽出し、有機層を 1 M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮し、中間体 (1.15 g)を得た。これをジクロロメタン (20 ml)に溶解させ、室温でTFA (8 ml)を加え、同温で 1 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、ヘキサンでトリチュレーションを行って、目的物 **32b** (1.0 g, quant.)を無色固形物として得た。

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.84-1.00 (6H, m), 1.41 (9H, s), 1.69-2.46 (5H, m), 3.35-3.60 (2H, m), 4.47 (1H, m), 4.57 (2H, s), 4.63 (1H, d), 4.72 (1H, d), 5.20 (1H, dd), 6.75-7.85 (7H, m), 8.45 (1H, d); MS (LSI, positive) *m/z* 624 [(M+H)⁺].

化合物 **32b** の合成と同様に反応を行い、以下の化合物を合成した。

[4-(2-{[(2*S*)-1-{4-[(2,2-Dimethylpropanoyl)oxy]-1,3-benzoxazol-2-yl}-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]amino}-2-oxoethoxy)phenoxy]acetic acid (32a)

2.0 g (foam, 69% from **43**); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.87 (3H, s), 0.96 (3H, s), 1.40 (9H, s), 2.43 (1H, m), 4.54 (2H, s), 4.58 (2H, s), 5.30 (1H, dd), 6.75-6.88 (4H, m), 7.34 (1H, d), 7.67 (1H, dd), 7.83 (1H, d), 8.45 (1H, d), 12.9 (1H, br s); MS (LSI, positive) *m/z* 527 [(M+H)⁺].

1-[[4-(Carboxymethoxy)phenoxy]acetyl]-*N*-{(2*S*)-3-methyl-1-[4-(3-methylbutoxy)-1,3-benzoxazol-2-yl]-1-oxobutan-2-yl}-L-prolinamide (32c)

0.82 g (crystalline powder, 80% from **46a**); Mp 106-110°C; ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.83-0.98 (12H, m), 1.67-2.45 (8H, m), 3.36-3.60 (2H, m), 4.27-4.76 (7H, m), 5.17 (0.5H, dd), 5.26 (0.5H, dd), 6.73-8.47 (8H, m); MS (LSI, positive) *m/z* 610 [(M+H)⁺].

1-[[4-(Carboxymethoxy)phenoxy]acetyl]-*N*-[(2*S*)-1-(4-hydroxy-1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (32d)

0.95 g (foam, 95% from **46a**); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ) 0.87-1.00 (6H, m), 1.70-2.45 (5H, m), 3.53 (2H, m), 4.45-4.76 (5H, m), 5.27 (1H, dd), 6.72-6.90 (5H, m), 7.23 (1H, dd), 7.41 (1H, dd), 8.40 (1H, d), 10.8 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 540 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

***N*-{[4-(Carboxymethoxy)phenoxy]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-{4-[(2,2-dimethylpropanoyl)oxy]-1,3-benzoxazol-2-yl}-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (**32e**)**
0.23 g (foam, 32% from **46b**); $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ) 0.80-1.02 (12H, m), 1.40 (9H, s), 1.71-2.44 (6H, m), 3.50-3.65 (2H, m), 4.36-4.62 (6H, m), 5.23 (1H, dd), 6.86 (4H, m), 7.33 (1H, d), 7.67 (1H, dd), 7.80 (1H, d), 7.96 (1H, d), 8.40 (1H, d), 12.9 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 723 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

2-(4-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethoxy)phenoxy)acetic acid (35a**) の合成**

tert-Butyl(4-hydroxyphenoxy)acetate⁷⁾ (26 g) の *N, N*-ジメチルホルムアミド (200 ml) 溶液に、室温で K_2CO_3 (32 g) および benzyl bromoacetate (32 g) を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を水中にわけ酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、 MgSO_4 乾燥して減圧濃縮した。濃縮残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン: 酢酸エチル = 10:1 \rightarrow 8:1) で精製して、中間体 (40.4 g) を得た。得られた中間体に酢酸エチル (150 ml) を加えた後、室温で 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ (4.04 g) を加え、水素気流下 1 時間攪拌した。反応液を濾過後、濾液を減圧濃縮し濃縮残渣をヘキサンでトリチュレーションして、目的物 **35b** (30 g, 92%) を無色結晶として得た。
Mp 95-97°C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ) 1.42 (9H, s), 4.56 (2H, s), 4.59 (2H, s), 6.83 (4H, s), 12.9 (1H, s); MS (LSI, positive) m/z 283 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

2-7-3. 2-3, 2-4 に関する実験

2-7-3-1. 水溶性基 **35b-u** の合成

2-7-3-1-1. **35h** の合成

Benzyl (2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl)acetate

2,4-dioxypyrimidine (1.0 g) の *N, N*-ジメチルホルムアミド (10 ml) 溶液にブromo酢酸ベンジル (2.5 g) 及び K_2CO_3 (2.5 g) を加え、室温にて 15 時間攪拌した。反応液を水中に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。抽出液を飽和食塩水で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥した。溶媒を減圧濃縮し、析出した結晶をエーテルで洗浄して、目的物 (1.4 g, 60%) を無色結晶として得た。

Mp 192-194°C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$, δ) 4.59 (2H, s), 5.20 (2H, s), 5.62 (1H, d), 7.37 (5H, m), 7.65 (1H, d), 11.4 (1H, s); MS (LSI, positive) m/z 261 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

Benzyl *tert*-butyl 2,2'-(2,4-dioxypyrimidine-1,3(2*H*,4*H*)-diyl)diacetate

上記化合物 1.0 g の *N,N*-ジメチルホルムアミド (10 ml) 溶液に、氷冷下 60%水素化ナトリウム(0.18 g) を徐々に加えた後、氷冷下 15 分間攪拌した。次いで、ブROMO酢酸*t*-ブチル (0.9 g) を加え、室温で 1 時間攪拌後、反応液に飽和の塩化アンモニウム水を加え、過剰の水素化ナトリウムを分解した。酢酸エチルで抽出し、抽出液を飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄で乾燥した。溶媒を減圧濃縮し、残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=2:1)で精製して、目的物 (1.2 g, 84%)を無色油状物として得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.46 (9H, s), 4.51 (2H, s), 4.58 (2H, s), 5.21 (2H, s), 5.81 (1H, d), 7.10 (1H, d), 7.36 (5H, m); MS (LSI, positive) m/z 375 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetic acid (35h)

上記化合物 (1.2 g) の酢酸エチル (20 ml) 溶液に 20% Pd(OH)₂-C (50 mg) を加え、水素気流下室温にて 1 時間攪拌した。触媒を濾去した後、濾液を減圧濃縮し、目的物 **35a** (0.7g, 77%)をfoamとして得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.46 (9H, s), 4.51 (2H, s), 4.59 (2H, s), 5.86 (1H, d), 7.17 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 285 [(M+H)⁺].

2-7-3-1-2 35r (12)の合成

Di-*tert*-Butyl 2,2'-(2-oxoimidazolidine-1,3-diyl)diacetate

2-Oxo-imidazolidine (10.0 g) の *N,N*-ジメチルホルムアミド (200 ml) 溶液に、室温でブROMO酢酸 *t*-ブチル (50.7 g) を滴下後氷冷し、氷冷下リチウム *t*-ブトキシド (20.5 g) を加え同温度で 30 分間攪拌し、次いで室温 1 時間攪拌した。反応液を氷中に注ぎ、析出した結晶を水で洗浄後送風乾燥した。粗結晶を酢酸エチルから再結晶し、目的物 (26.0 g, 69%)を無色結晶として得た。

Mp 100-102°C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.46 (18H, s), 3.54 (4H, s), 3.89 (4H, s); MS (LSI, positive) m/z 315 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-*tert*-Butoxy-2-oxo-ethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetic acid (35r)

上記化合物 (1.14 g) のエタノール-水 (1:1, 20 ml) 溶液にKOH (0.27 g) を加え 70°Cにて 5 時間攪拌した。エタノールを減圧留去した後、残渣に飽和炭酸水素ナトリウム溶液を加え塩基性にし、水層を酢酸エチルで洗浄した。次いで水層を 10% 塩酸で酸性にした後酢酸エチルで抽出し、有機層をMgSO₄で乾燥した後減圧濃縮し、濃縮残渣を酢酸エチルから再結晶し、目的物 **35r** (0.3 g, 31%) を無色結晶として得た。

Mp 112-113°C; ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.46 (9H, s), 3.53 (4H, s), 3.89 (2H, s), 4.01 (2H, s), 7.11 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 259 [(M+H)⁺].

2-7-3-1-3. 35b-uの合成

化合物 **35a**, **35h**, **35r** の合成と同様に反応を行い、以下 **35b-u** の化合物を合成した。

(E)-4-tert-Butoxy-4-oxobut-2-enoic acid (35b)

0.23 g (powder, 42%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.50 (9H, s), 6.71 (3H, s), 7.47 (1H, s); MS (LSI, positive) m/z 173 [(M+H)⁺].

(S)-2-(1-tert-Butoxy-1-oxopropan-2-ylamino)-2-oxoacetic acid (35c)

0.95 g (powder, 79%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.47 (3H, s), 1.48 (9H, s), 4.44 (1H, m), 7.84 (1H, m); MS (LSI, positive) m/z 218 [(M+H)⁺].

2-[2-(2-tert-butoxy-2-oxoethoxy)phenoxy]acetic acid (35d)

25.5 g (powder, 89%); ¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 1.42 (9H, s), 4.65 (2H, s), 4.68 (2H, s), 6.98 (4H, m), 12.9 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 283 [(M+H)⁺].

4-(2-tert-butoxy-2-oxoethoxy)benzoic acid (35e)

2.0 g (powder, 91%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.49 (9H, s), 4.59 (2H, s), 6.94 (2H, d), 8.07 (2H, d); MS (LSI, positive) m/z 253 [(M+H)⁺].

(S)-2-[4-(1-tert-butoxy-1-oxopropan-2-ylcarbamoxy)phenoxy]acetic acid (35f)

1.53 g (powder, 21%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.49 (12H, m), 4.64 (3H, m), 6.84 (1H, m), 6.95 (2H, m), 7.78 (2H, m); MS (LSI, positive) m/z 324 [(M+H)⁺].

2-[4-(2-tert-butoxy-2-oxoethoxy)benzamido]acetic acid (35g)

1.53 g (powder, 81%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.47 (9H, s), 4.18 (2H, m), 4.54 (2H, s), 5.96 (1H, br s), 6.89 (2H, d), 7.09 (1H, m), 7.76 (2H, d); MS (LSI, positive) m/z 310 [(M+H)⁺].

2-[4-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-6-methyl-3,5-dioxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-2(3H)-yl]acetic acid (35i)

1.95 g (powder, 27%); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 1.42 (9H, s), 2.16 (3H, s), 4.48 (2H, s), 4.60 (2H, s), 13.3 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 300 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-2,6-dioxo-2,3-dihydropyrimidin-1(6H)-yl]acetic acid (35j)

2.1 g (powder, 50%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.49 (9H, s), 4.42 (2H, s), 4.67 (2H, s), 5.83 (1H, d), 7.31 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 285 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-tert-butoxy-2-oxoethyl)-5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2H)-yl]

acetic acid (35k)

5.4 g (powder, 38%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.48 (9H, s), 1.96 (3H, d), 4.49 (2H, s), 4.61 (2H, s), 6.98 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 299 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-2,6-dioxotetrahydropyrimidin-1(2H)-yl]acetic acid (35l)

1.5 g (oil, 20%); ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 1.42 (9H, s), 2.73 (2H, t), 3.47 (2H, t), 4.05 (2H, s), 4.25 (2H, s); MS (LSI, positive) m/z 287 [(M+H)⁺].

2-[4-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-3,5-dioxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-2(3H)-yl]acetic acid (35m)

0.51 g (oil, 20%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.48 (9H, s), 4.61 (2H, 2), 4.70 (2H, s), 7.49 (1H, s), 7.67 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 286 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl]acetic acid (35n)

2.0 g (oil, 37%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.47 (9H, s), 4.11 (2H, 2), 4.18 (2H, s), 4.22 (2H, s); MS (LSI, positive) m/z 273 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl]acetic acid (35o)

1.8 g (oil, 40%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.48 (9H, s), 4.08 (2H, 2), 4.11 (2H, s), 4.31 (2H, s); MS (LSI, positive) m/z 273 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-5,5-dimethyl-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl]acetic acid (35p)

2.0g (oil, 68%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.44 (6H, s), 1.46 (9H, s), 4.08 (2H, s), 4.17 (2H, s); MS (LSI, positive) m/z 301 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-4,4-dimethyl-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl]acetic acid (35q)

1.55 g (oil, 68%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.41 (6H, s), 1.47 (9H, s), 3.93 (2H, s), 4.32 (2H, s); MS (LSI, positive) m/z 301 [(M+H)⁺].

2-[4-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-2,5-dioxopiperazin-1-yl]acetic acid (35s)

0.3 g (powder, 25%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.41 (9H, s), 4.06 (8H, m); MS (LSI, positive) m/z 287 [(M+H)⁺].

2-[4-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-2,3-dioxopiperazin-1-yl]acetic acid (35t)

0.81 g (powder, 23%); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.47 (9H, s), 3.71 (4H, s), 4.15

(2H, s), 4.22 (2H, s); MS (LSI, positive) m/z 287 $[(M+H)^+]$.

2-[4-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)piperazin-1-yl]acetic acid (35u)

19.3 g (powder, 53%); $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ) 1.46 (9H, s), 2.90 (4H, br s), 3.18 (2H, s), 3.32 (4H, br s), 3.51 (2H, s); MS (LSI, positive) m/z 259 $[(M+H)^+]$.

2-7-3-2. トリペプチド誘導体 **36b**, **36c**の合成

2-7-3-2-1. **36b**の合成

***N*-Benzyloxycarbonyl-L-valyl-*N*-[(1*S*)-3-methoxy-2-hydroxy-1-isopropyl-3-oxopropyl]-L-prolinamide**

(3*S*)-3-Amino-2-hydroxy-4-methylpentanoic acid hydrochloride salt⁸⁾ (1.0 g) に氷冷下 10%塩化水素-メタノール溶液 (30 ml)を加え、室温で 16.5 時間攪拌した。反応液をそのまま減圧濃縮後、残渣をピリジン (20 ml) に溶解した。室温で EDC (1.6 g) および Cbz-Val-Pro (1.9 g) を加え、同温で 15 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、 MgSO_4 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (クロロホルム:メタノール=50:1→20:1)で精製して、目的物 (0.64 g, 24%) を foam として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ) 0.89-1.03 (12H, m), 1.81-2.35 (6H, m), 3.38-4.57 (10H, m), 5.02-5.13 (2H, m), 5.61 (0.5H, d), 5.74 (0.5H, d), 6.82 (0.5H, d), 6.99 (0.5H, d), 7.34 (5H, m); MS (LSI, positive) m/z 492 $[(M+H)^+]$.

***L*-Valyl-*N*-[(1*S*)-(3-benzylamino-1-isopropyl-2-hydroxy-3-oxo-propyl)-L-prolinamide (**36b**)**

上記化合物 (0.3 g) の酢酸エチル (30 ml) 溶液に、室温で触媒量の 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ を加え、水素気流下 4 時間攪拌した。反応液を濾過後、濾液を減圧濃縮して減圧濃縮し、目的物 **36b** (0.19 g, 90%) を無色油状物として得た。この化合物はこれ以上精製することなく、次の反応に使用した。

MS (LSI, positive) m/z 358 $[(M+H)^+]$

2-7-3-2-2. **36c**の合成

(3*S*)-3-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxy-4-methylbutyric acid ethyl ester

(3*S*)-3-Benzyloxycarbonylamino-2-hydroxy-4-methylpentanenitrile²⁾ (62.0 g) に氷冷下で 30%塩化水素-エタノール溶液 (500 ml)を加え、室温で 15 時間攪拌した。反応液をそのまま減圧濃縮し、濃縮残渣に室温でテトラヒドロフラン (250 ml) および水 (250 ml)を加え、同温で 30 分攪拌した。エタノールを減圧留去後、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、 MgSO_4 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=7:3)で精

製して、目的物 (40.0 g, 55%) を無色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ) 0.92-1.05 (6H, m), 1.21-1.30 (3H, m), 1.84-1.93 (1H, m), 3.01-3.10 (1H, m), 3.76-3.90 (1H, m), 4.14-4.36 (3H, m), 4.96-5.16 (3H, m), 7.26-7.38 (5H, m); MS (LSI, positive) m/z 310 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

**(1S)-3-Benzylamino-1-benzyloxycarbonylamino-1-isopropyl-2-hydroxy-3-oxo
propane**

LiAlH_4 のテトラヒドロフラン (200 ml) 懸濁液を 1.5 時間加熱還流後、室温になるまで冷却し、反応液にベンジルアミン (17.3 g) を同温で滴下した⁹⁾。次に上記化合物 (10.0 g) のテトラヒドロフラン (150 ml) 溶液を室温で滴下し、同温で 12 時間攪拌した。反応液へ氷冷下、水をゆっくりと加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、 MgSO_4 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=1:1) で精製して、目的物 (9.0 g, 75%) を無色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ) 0.97 (3H, d), 1.04 (3H, d), 2.28 (1H, m), 3.45 (1H, br t), 4.29-4.49 (4H, m), 5.02 (2H, dd), 5.13 (1H, d), 5.43 (1H, d), 7.07 (1H, m), 7.21-7.38 (10H, m); MS (LSI, positive) m/z 371 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

**N-Benzylloxycarbonyl-L-valyl-N-[(1S)-3-benzylamino-2-hydroxy-1-isopropyl-3-oxo
propyl]-L-prolinamide**

上記化合物 (9.0 g) のエタノール (200 ml) 溶液に、室温で触媒量の 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ を加え、水素気流下 1 時間攪拌した。反応液を濾過後、濾液を減圧濃縮して濃縮残渣を得た。この濃縮残渣のジクロロメタン (200 ml) 溶液に、Cbz-Val-Pro (10.2 g) および EDC (5.6 g) を加え、室温において終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、 MgSO_4 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (クロロホルム:メタノール=100:1) で精製して、目的物 (4.6 g, 33%) を無色油状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ) 0.79-1.06 (12H, m), 1.77-2.35 (5H, m), 3.56 (1H, m), 3.73 (1H, m), 4.23-4.45 (4H, m), 5.06 (1H, d), 5.11 (1H, d), 5.48 (1H, br t), 7.17-7.42 (11H, m); MS (LSI, positive) m/z 567 $[(\text{M}+\text{H})^+]$.

**L-Valyl-N-[(1S)-(3-benzylamino-1-isopropyl-2-hydroxy-3-oxo-propyl)-L-prolinamide
(36c)**

上記化合物 (4.6 g) のエタノール (100 ml) 溶液に、室温で触媒量の 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$ を加え、水素気流下 2 時間攪拌した。反応液を濾過後、濾液を減圧濃縮して減圧濃縮し、目的物 **36c** (3.5 g, quant.) を無色油状物として得た。この化合物はこれ以上精製することなく、次の反応に使用した。

MS (LSI, positive) m/z 433 $[(M+H)^+]$.

2-7-3-3. **32f-m**の合成

2-7-3-3-1. **32f**の合成

***N*-{[4-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethoxy)phenoxy]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl]-L-prolinamide (37f)**

化合物 **36a**²⁾ (5.3 g) のピリジン (100 ml) 溶液に化合物 **35a** (3.2 g) および EDC (2.6 g) を加え、室温にて終夜撹拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、 $MgSO_4$ 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=1:1) で精製して、目的物 **37f** (5.7 g, 66%) を foam として得た。

MS (LSI, positive) m/z 681 $[(M+H)^+]$.

***N*-{[4-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethoxy)phenoxy]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (38f)**

化合物 **37f** (2.4 g) のジクロロメタン (30 ml) 溶液に *t*-ブチルアルコール (0.27 g) および DMP (3.3 g) を加え、室温にて終夜撹拌した。反応液を飽和チオ硫酸ナトリウム溶液に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、 $MgSO_4$ 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=1:1→1:2) で精製して、目的物 **38f** (2.0 g, 83%) を foam として得た。

MS (LSI, positive) m/z 679 $[(M+H)^+]$.

***N*-{[4-(Carboxymethoxy)phenoxy]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (32f)**

化合物 **38f** (5.2 g) のジクロロメタン (40 ml) 溶液に TFA (16 ml) を加え、室温にて終夜撹拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を逆相カラム (担体: CHP-20P, 分離液: アセトニトリル:水=0:100→50:50) で精製して、目的物 **32f** (3.2 g, 67%) を無色固形物として得た。

1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$, δ) 0.90-1.13 (12H, m), 1.99-2.26 (5H, m), 2.50 (1H, m), 3.71 (1H, m), 3.94 (1H, m), 4.45-4.68 (6H, m), 5.61 (1H, dd), 6.77-6.87 (4H, m), 7.25 (1H, d), 7.47 (1H, ddd), 7.56 (1H, ddd), 7.66 (2H, d), 7.92 (1H, d); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for $C_{32}H_{37}O_9N_4$ $[(M-H)^-]$: 621.2555, found 621.2565

2-7-3-3-2. **32g-m**の合成

化合物 **32f** の合成と同様に反応を行い、以下 **32g-m** の化合物を合成した。

***N*-[(2*E*)-3-Carboxyprop-2-enoyl]-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-**

1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (32g)

(0.4 g, 16.2%) was prepared from **36a** and **35b** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.89-1.06 (12H, m), 1.96-2.49 (6H, m), 3.74 (1H, m), 4.11 (1H, m), 4.68 (1H, dd), 4.76 (1H, dd), 5.72 (1H, dd), 6.74-8.07 (8H, m); MS (LSI, positive) m/z 513 [(M+H)⁺].

N-(Carboxyacetyl)-L-valyl-N-[(2S)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (32h)

(2.6 g, 72%) was prepared from **36a** and malonic acid *mono-tert*-butyl ester as white powder.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.87-1.06 (12H, m), 1.70-2.47 (6H, m), 3.15 (1H, d), 3.26 (1H, d), 3.36-3.80 (2H, m), 4.34 (1H, dd), 4.50 (1H, dd), 5.27 (1H, dd), 7.55 (1H, dd), 7.65 (1H, dd), 7.90 (1H, d), 8.02 (1H, d), 8.24 (1H, d), 8.43 (1H, d), 12.4 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 501 [(M+H)⁺].

N-[(2S)-1-[(2S)-2-[(2S)-1-(1,3-Benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]carbamoyl]pyrrolidin-1-yl]-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]amino)(oxo)acetyl]-L-alanine (32i)

(0.21 g, 8.5%) was prepared from **36a** and **35c** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ): 0.88-1.09 (12H, m), 1.52 (3H, d), 2.00 (2H, m), 2.19 (3H, m), 2.50 (1H, m), 3.70 (1H, m), 3.82 (1H, m), 4.53 (1H, dd), 4.65 (2H, m), 5.60 (1H, dd), 7.30 (1H, d), 7.43 (1H, dd), 7.55 (1H, dd), 7.66 (1H, d), 7.92 (2H, m), 8.03 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 558 [(M+H)⁺].

N-{[2-(Carboxymethoxy)phenoxy]acetyl}-L-valyl-N-[(2S)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (32j)

(1.8 g, 53%) was prepared from **36a** and **35d** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.78-1.02 (12H, m), 1.70-2.05 (5H, m), 2.39 (1H, m), 3.54 (1H, m), 3.64 (1H, m), 4.40 (1H, dd), 4.49 (1H, dd), 4.56 (2H, s), 4.68 (2H, s), 5.26 (1H, dd), 6.85-6.97 (4H, m), 7.54 (1H, ddd), 7.64 (1H, ddd), 7.88-8.02 (3H, m), 8.44 (1H, d), 13.0 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 623 [(M+H)⁺].

[4-[(2S)-1-[(2-[(2S)-1-(1,3-Benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]amino)-2-oxoethyl](propyl)amino]-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]carbamoyl]phenoxy]acetic acid (32k)

(1.4 g, 66%) was prepared from **36a** and **35e** as white powder.

¹H-NMR (200 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.87-1.04 (12H, m), 1.73-2.47 (6H, m), 3.60 (1H, m), 3.89 (1H, m), 4.42 (1H, dd), 4.53 (1H, dd), 4.76 (2H, s), 5.28 (1H, dd), 6.96 (2H, d), 7.55

(1H, dd), 7.66 (1H, dd), 7.87 (3H, m), 8.03 (1H, d), 8.35 (1H, d), 8.44 (1H, d), 13.1 (1H, br s); MS (LSI, positive) m/z 593 $[(M+H)^+]$.

***N*-({[4-[2-({(2*S*)-1-[(2*S*)-2-[(2*S*)-1-(1,3-Benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl] carbamoyl]pyrrolidin-1-yl]-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]amino)-2-oxoethoxy]phenyl} carbonyl)-L-alanine (32l)**

(1.6 g, 51%) was prepared from **36a** and **35f** as white powder.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ) 0.90-1.10 (12H, m), 1.56 (3H, d), 2.04-2.55 (6H, m), 3.75 (1H, m), 4.02 (1H, m), 4.58-4.80 (5H, m), 5.64 (1H, dd), 6.79 (1H, d), 7.08 (3H, m), 7.47 (1H, dd), 7.56 (1H, dd), 7.67 (1H, d), 7.81 (2H, d), 7.92 (1H, d), 7.99 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 664 $[(M+H)^+]$.

***N*-{[4-(Carboxymethoxy)phenyl]carbonyl}glycyl-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (32m)**

(1.3 g, 36%) was prepared from **36a** and **35g** as white powder.

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$, δ) 0.83-1.00 (12H, m), 1.81-2.39 (6H, m), 3.55 (1H, m), 3.69 (1H, m), 3.90 (2H, m), 4.33 (1H, m), 4.50 (1H, m), 4.76 (2H, s), 5.26 (1H, dd), 6.94-8.05 (9H, m), 8.44 (1H, d), 8.57 (1H, dd); MS (LSI, positive) m/z 650 $[(M+H)^+]$.

2-7-3-4. **34a-u**の合成

2-7-3-4-1. **34a**の合成

***N*-{[3-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-1-hydroxy-3-methylbutan-2-yl]-L-prolinamide (47a)**

化合物 **36a**²⁾ (1.0 g) のピリジン (20 ml) 溶液に化合物 **35h** (0.7 g) および EDC (0.58 g) を加え、室温にて終夜撹拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を 1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、 MgSO_4 乾燥し減圧濃縮して目的物 **47a** (1.5 g, 88%) を foam として得た。MS (LSI, positive) m/z 683 $[(M+H)^+]$.

***N*-{[3-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (48a)**

化合物 **47a** (1.5 g) のジクロロメタン (30 ml) 溶液に *t*-ブチルアルコール (0.16 g) および DMP (1.9 g) を加え、室温にて 1 時間撹拌した。反応液を飽和チオ硫酸ナトリウム溶液に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、 MgSO_4 乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=0:100) で精製して、目的

物 **48a** (1.2 g, 80%)をfoamとして得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.90-1.09 (12H, m), 1.44 (9H, m), 1.90-2.30 (5H, m), 2.50 (1H, m), 3.67 (1H, m), 3.78 (1H, m), 4.26 (1H, d), 4.54-4.75 (5H, m), 5.69 (1H, dd), 5.83 (1H, d), 7.42-7.57 (4H, m), 7.66 (1H, d), 7.91 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 681 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (**34a**)**

化合物 **48a** (1.2 g) のジクロロメタン (30 ml)溶液にTFA (15 ml)を加え、室温にて1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をエーテルでトリチュレーションし、目的物 **34a** (1.0 g, 91%)を無色固形物として得た。

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.85-1.05 (12H, m), 1.70-2.05 (5H, m), 2.38 (1H, m), 3.55 (1H, m), 3.64 (1H, m), 4.32 (1H, dd), 4.40-4.55 (5H, m), 5.28 (1H, dd), 5.75 (1H, dd), 7.55 (1H, dd), 7.64 (2H, m), 7.90 (1H, d), 8.01 (1H, d), 8.45 (2H, m), 12.9 (1H, s); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₃₀H₃₅O₉N₆ [(M-H)⁻]:623.2460, found 623.2458

2-7-3-4-2. **34t** (AE-3763)および **34u**の合成

***N*-{[3-(2-tert-Butoxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide (**47t**)**

化合物 **36d**⁴⁾ (1.21 g)のピリジン (50 ml)溶液に化合物 **35r** (0.85 g)および EDC (0.69 g)を加え、室温にて終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮した後、残渣に水を加えて酢酸エチルで抽出し、有機層を1 M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (クロロホルム:メタノール=30:1)で精製して、目的物 **47t** (1.13 g, 57%)をfoamとして得た。MS (LSI, positive) m/z 608 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(2-tert-Butoxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1,1,1-trifluoro-4-methyl-2-oxopentan-3-yl]-L-prolinamide (**48t**)**

化合物 **47t** (1.1 g) のジクロロメタン (10 ml)溶液に*t*-ブチルアルコール (0.18 g)および DMP (1.54 g)を加え、室温にて終夜攪拌した。反応液を飽和チオ硫酸ナトリウム溶液に注ぎ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和チオ硫酸ナトリウム溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄乾燥後減圧濃縮して、目的物 **48t** (0.98 g, 90%)をfoamとして得た。

MS (LSI, positive) m/z 606 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1,1,1-trifluoro-4-methyl-2-oxopentan-3-yl]-L-prolinamide (**34t**, AE-3763)および**

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*R*)-1,1,1-trifluoro-4-methyl-2-oxopentan-3-yl]-L-prolinamide (34u)**

化合物 **48t** (0.97 g) のジクロロメタン (10 ml) 溶液に TFA (5 ml) を加え、室温にて終夜撹拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を逆相カラム (担体: CHP-20P, 分離液: アセトニトリル:水=0:100→20:80) で精製して、目的物 **34t** (190 mg, 21.6%) を白色結晶として、**34u** (250 mg, 28.4%) を foam として得た。

34t, AE-3763: Mp 177-178°C; $[\alpha]_D^{20}$ -63.0° (c=1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.85-1.02 (12H, m), 1.90-2.31 (6H, m), 3.51 (4H, m), 3.68 (1H, m), 3.81-4.13 (5H, m), 4.58 (2H, m), 4.92 (1H, dd), 7.45 (2H, m); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₂₃H₃₃O₇N₅F₃ [(M-H)⁻]: 548.2327, found 548.2329.

34u: ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.86-1.06 (12H, m), 1.88-2.40 (6H, m), 3.47-4.02 (10H, m), 4.57 (1H, dd), 4.68 (1H, dd), 4.88 (1H, dd), 7.33 (1H, d), 7.71 (1H, d); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₂₃H₃₃O₇N₅F₃ [(M-H)⁻]: 548.2332, found 548.2328.

2-7-3-4-3. 34b-s の合成

化合物 **34a**, **34t** の合成と同様に反応を行い、以下 **34b-s** の化合物を合成した。

***N*-{[4-(Carboxymethyl)-6-methyl-3,5-dioxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-2(3*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34b)**

(1.25 g, 45.7%) was prepared from **36a** and **35i** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.85-1.01 (12H, m), 1.71-2.06 (5H, m), 2.15 (3H, s), 2.36-2.42 (1H, m), 3.48-3.66 (2H, m), 4.31 (1H, dd), 4.47 (2H, s), 4.52 (1H, dd), 4.60 (2H, s), 5.28 (1H, dd), 7.53-7.68 (2H, m), 7.96 (2H, dd), 8.46 (2H, m), 13.1 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₃₀H₃₆O₉N₇ [(M-H)⁻]: 638.2569, found 623.2586.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2,6-dioxo-3,6-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34c)**

(0.92 g, 41.6%) was prepared from **36a** and **35j** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.82-1.01 (12H, m), 1.71-2.05 (5H, m), 2.38 (1H, m), 3.53 (1H, m), 3.62 (1H, m), 4.29 (1H, dd), 4.41-4.52 (5H, m), 5.27 (1H, dd), 5.75 (1H, d), 7.55 (1H, ddd), 7.65 (1H, ddd), 7.72 (1H, d), 7.90 (1H, d), 8.02 (1H, d), 8.35 (1H, d), 8.45 (1H, d), 13.1 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₃₀H₃₅O₉N₆ [(M-H)⁻]: 623.2460, found 623.2462.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-5-methyl-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34d)**

(2.0 g, 68.1%) was prepared from **36a** and **35k** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.86-1.01 (12H, m), 1.68-2.04 (5H, m), 1.81 (3H, s), 2.38 (1H, m), 3.36-3.68 (6H, m), 4.31 (1H, dd), 4.50 (1H, dd), 5.28 (1H, dd), 7.53-7.68 (3H, m), 7.90 (1H, d), 8.02 (1H, d), 8.45 (2H, m), 12.9 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₃₁H₃₇O₉N₆ [(M-H)⁻] 637.2617, found 637.2628.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2,6-dioxotetrahydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (**34e**)**

(1.7 g, 52.1%) was prepared from **36a** and **35l** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.82-1.00 (12H, m), 1.70-2.04 (5H, m), 2.38 (1H, m), 2.70 (2H, t), 3.46 (2H, t), 3.50 (1H, m), 3.63 (1H, m), 4.07 (2H, s), 4.25 (2H, s), 4.29 (1H, m), 4.51 (1H, dd), 5.27 (1H, dd), 7.55 (1H, dd), 7.65 (1H, dd), 7.90 (1H, d), 8.02 (1H, d), 8.19 (1H, d), 8.44 (1H, d), 12.8 (1H, s); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₃₀H₃₇O₉N₆ [(M-H)⁻] 625.2617, found 625.2624.

***N*-{[4-(carboxymethyl)-3,5-dioxo-4,5-dihydro-1,2,4-triazin-2(3*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (**34f**)**

(0.50 g, 44.5%) was prepared from **36a** and **35m** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.83-1.00 (12H, m), 1.71-2.09 (5H, m), 2.39 (1H, m), 3.34-3.56 (14H, m), 3.69 (1H, m), 4.33 (1H, dd), 4.50 (1H, m), 5.29 (1H, m), 7.55 (1H, dd), 7.65 (1H, dd), 7.90 (1H, d), 8.02 (1H, d), 8.26 (1H, m), 8.43 (2H, m); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₂₉H₃₄O₉N₇ [(M-H)⁻] 624.2413, found 624.2413.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (**34g**)**

(1.80 g, 65.8%) was prepared from **36a** and **35n** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.83-1.01 (12H, m), 1.72-2.09 (5H, m), 2.36-2.42 (1H, m), 3.51-3.74 (2H, m), 4.05-4.14 (6H, m), 4.34 (1H, t), 4.52 (1H, dd), 5.29 (1H, dd), 7.53-7.69 (2H, m), 7.96 (2H, dd), 8.37 (1H, d), 8.44 (1H, d), 13.0 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₂₉H₃₅O₉N₆ [(M-H)⁻] 611.2460, found 611.2466.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (**34h**)**

(1.24 g, 47.2%) was prepared from **36a** and **35o** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.84-1.01 (12H, m), 1.72-2.04 (5H, m), 2.35-2.40 (1H, m), 3.49-3.69 (2H, m), 4.04-4.12 (6H, m), 4.31 (1H, t), 4.52 (1H, dd), 5.26-5.30 (1H, m), 7.53-7.68 (2H, m), 7.96 (2H, dd), 8.42 (2H, m), 13.0 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₂₉H₃₅O₉N₆ [(M-H)⁻] 611.2460, found 611.2475.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-5,5-dimethyl-2,4-dioxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34i)**

(1.27 g, 31.0%) was prepared from **36a** and **35p** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.83-1.01 (12H, m), 1.29 (6H, s), 1.72-2.02 (4H, m), 2.33-2.44 (1H, m), 3.50-3.72 (2H, m), 3.99 (2H, s), 4.09 (2H, s), 4.35 (1H, dd), 4.50 (1H, dd), 5.27 (1H, dd), 7.53-7.68 (2H, m), 7.96 (2H, dd), 8.22 (1H, d), 8.44 (1H, d), 13.0 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₃₁H₃₉O₉N₆ [(M-H)⁻] 639.2773, found 639.2789.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-4,4-dimethyl-2,5-dioxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34j)**

(1.04 g, 32.1%) was prepared from **36a** and **35q** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.84-1.01 (12H, m), 1.31 (6H, s), 1.71-2.07 (5H, m), 2.34-2.42 (1H, m), 3.49-3.65 (2H, m), 4.04-4.06 (4H, m), 4.35 (1H, dd), 4.52 (1H, dd), 5.28 (1H, dd), 7.53-7.68 (2H, m), 7.96 (2H, dd), 8.36 (1H, d), 8.45 (1H, d), 12.8 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₃₁H₃₉O₉N₆ [(M-H)⁻] 639.2773, found 639.2781.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34k)**

(0.3 g, 41.3%) was prepared from **36a** and **35r** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.82-1.13 (12H, m), 1.88-2.28 (5H, m), 2.50 (1H, m), 3.25-3.74 (5H, m), 3.82-4.12 (5H, m), 4.54-4.71 (2H, m), 5.65 (1H, m), 7.35-7.59 (4H, m), 7.66 (1H, d), 7.91 (1H, d); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₂₉H₃₇O₈N₆ [(M-H)⁻] 597.2667, found 597.2668.

***N*-{[4-(Carboxymethyl)-2,5-dioxopiperazin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34l)**

(1.93 g, 70.0%) was prepared from **36a** and **35s** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.86-1.11 (12H, m), 1.91-2.25 (5H, m), 2.51 (1H, m), 3.19 (1H, br s), 3.69 (1H, m), 3.83 (1H, m), 4.00-4.31 (8H, m), 4.55-4.69 (2H, m), 5.65 (1H, dd), 7.36-7.59 (3H, m), 7.66 (2H, d), 7.91 (1H, d); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₃₀H₃₇O₉N₆ [(M-H)⁻] 625.2617, found 625.2613.

***N*-{[4-(carboxymethyl)-2,3-dioxopiperazin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34m)**

(0.7 g, 30.0%) was prepared from **36a** and **35t** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.82-1.13 (12H, m), 1.90-2.73 (6H, m), 3.56-3.90 (6H, m), 4.13-4.36 (4H, m), 4.54-4.69 (2H, m), 5.64 (1H, dd), 7.39 (1H, br d), 7.47 (1H, t), 7.55 (1H, t), 7.66 (1H, d), 7.74 (1H, br d), 7.91 (1H, d); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₃₀H₃₇O₉N₆ [(M-H)⁻] 625.2617, found 625.2619.

***N*-{[4-(Carboxymethyl)piperazin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*)-1-(1,3-benzoxazol-2-yl)-3-methyl-1-oxobutan-2-yl]-L-prolinamide (34n)**

(0.82 g, 20.6%) was prepared from **36a** and **35u** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.84-1.00 (12H, m), 1.71-2.06 (5H, m), 2.39 (1H, m), 3.29-4.03 (14H, m), 4.37 (1H, dd), 4.51 (1H, m), 5.28 (1H, dd), 7.56 (1H, dd), 7.66 (1H, dd), 7.91 (1H, d), 8.02 (1H, d), 8.47 (1H, m), 8.69 (1H, m); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₃₀H₄₁O₇N₆ [(M-H)⁻] 597.3037, found 597.3038.

***N*-{[4-(Carboxymethyl)-2,3-dioxopiperazin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1-(benzylamino)-4-methyl-1,2-dioxopentan-3-yl]-L-prolinamide (34o)**

(0.65 g, 41%) was prepared from **36c** and **35t** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.73-1.00 (12H, m), 1.67-2.30 (6H, m), 4.00-4.20 (5H, m), 4.23-4.42 (4H, m), 4.49 (1H, m), 4.95 and 5.01 (1H, each dd), 8.16 (1H, d), 8.32 (1H, d), 9.24 (1H, t); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₃₁H₄₁O₉N₆ [(M-H)⁻] 641.2930, found 641.2947.

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1-(benzylamino)-4-methyl-1,2-dioxopentan-3-yl]-L-prolinamide (34p)**

(3.0 g, 58.0%) was prepared from **36c** and **35h** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.75-1.06 (12H, m), 1.88-2.50 (6H, m), 3.65 (1H, m), 3.78 (1H, m), 4.35-4.69 (7H, m), 4.94 (1H, d), 5.82 (1H, d), 7.15 (1H, d), 7.18-7.40 (5H, m), 8.07 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₃₁H₃₉O₉N₆ [(M-H)⁻] 639.2773, found 639.2775

***N*-{[4-(Carboxymethyl)-2,3-dioxopiperazin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1-methoxy-4-methyl-1,2-dioxopentan-3-yl]-L-prolinamide (34q)**

(30 mg, 5.2%) was prepared from **36b** and **35t** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.81-1.38 (12H, m), 1.86-3.00 (7H, m), 3.53-3.95 (9H, m), 4.03-4.35 (4H, m), 4.47-4.69 (2H, m), 5.02 (1H, m); MS (APCI, positive) m/z 568 [(M+H)⁺]

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1-methoxy-4-methyl-1,2-dioxopentan-3-yl]-L-prolinamide (34r)**

(43 mg, 16.3%) was prepared from **36b** and **35h** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.81-0.92 (12H, m), 1.69-2.27 (7H, m), 3.77 (3H, s), 4.31-4.61 (7H, m), 5.74 (1H, d), 7.66 (1H, d), 8.38-8.48 (2H, m); MS (APCI, positive) *m/z* 566 [(M+H)⁺]

N-{{[3-(Carboxymethyl)-2,4-dioxo-3,4-dihydropyrimidin-1(2*H*)-yl]acetyl}-L-valyl-N-[(3*R,S*)-1,1,1-trifluoro-4-methyl-2-oxopent-3-yl]-L-prolinamide (34s)}

(1.25 g, 62.3%) was prepared from **36d** and **35h** as white powder.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.79-0.95 (12H, m), 1.69-2.23 (8H, m), 3.53-3.72 (2H, m), 4.24-4.64 (6H, m), 5.72-8.63 (5.5H, m), 12.9 (1H, br s); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₂₄H₃₁O₈N₅F₃ [(M-H)⁻] 574.2119, found 574.2130

2-7-4. Biological study

2-7-4-1. HNE阻害活性 (IC₅₀) 試験

1.9 M NaCl、0.38%ポリエチレングリコール 6000 および 0.0019% Brij-35 を含む HEPES (133 nM, pH7.5)緩衝液にHNE (1.9 m単位/ml, Sigma社)を溶解した液を調製した。この溶液の 210 μlと 40 μlの試験化合物の溶液(10⁻⁸~10⁻⁵ M)とを混合し、37°Cで 6 分間プレインキュベートした。これに 4 mMのサクシニル-Ala-Pro-Ala-4-メチルクマリル-7-アミド (基質溶液、ペプチド研究所)50 μlおよび蒸留水 100 μlを添加し、更に 37°Cで 20 分間反応させた後、生成した 7-アミノ-4-メチルクマリン濃度の蛍光強度 (励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm)を測定した。尚、前記「Brij-35」とはポリオキシエチレン(23)ラウリルエーテルを意味し、HEPESは*N*-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-*N'*-(2-エタンスルホン酸)を意味する。

HNE阻害活性 (阻害率)は次式に基づいて計算し、そして試験化合物の濃度-阻害率曲線より 50%阻害濃度 (IC₅₀値)を算出した。尚、次式においてAは試験化合物を添加した場合の蛍光強度を意味し、Bは試験化合物を添加しない場合の蛍光強度を意味する。

$$\text{阻害率 (\%)} = (1 - A / B) \times 100$$

2-7-4-2. HNE誘発肺障害に対する抑制作用

ハムスターに HNE を気管支内投与すると、肺において出血が誘発される。HNE 投与の一定時間後に経気道的に肺を洗浄して得られる気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中にはヘモグロビンが検出される。本実験は、BALF 中のヘモグロビン濃度を測定することで、化合物によってこの出血がどの程度抑制されるかを試験したものである。ハムスター (Syrian 系、8-10 週齢の雄性)を次の 3 群 (1 群 5 例)に分け、そして各群について以下の処理を行った。

(A)溶媒投与対照群（無処理群）

ハムスターの気管支内に 0.2 ml の生理食塩水を投与し、1 時間後に生理食塩水 2.5 ml で経気道的に肺胞を 5 回洗浄し、その BALF 12.5 ml 中のヘモグロビン濃度 (414 nm の吸光度)を測定した。その測定値を A とした。

(B)HNE 投与対照群（試験化合物非投与群）

25 単位の HNE (エラスチンプロダクト社)を溶解した生理食塩水 0.2 ml をハムスターの気管支内に投与して肺出血を誘発せしめた。HNE 投与の 1 時間後、(A)と同様にして BALF 中のヘモグロビン濃度を測定した。その測定値を B とした。

(C)HNE 投与対照群（試験化合物投与群）

ハムスターにリン酸緩衝化生理食塩水(PBS, pH7.4)に溶解させた所定量の試験化合物を後述*の方法により投与し、次に前記と同様の方法により HNE を投与した。そして、HNE 投与の 1 時間後、(A)と同様にして BALF 中のヘモグロビン濃度を測定した。その測定値を C とした。

*試験化合物の投与方法について

試験化合物のハムスターへの投与は 2 種類の方法で行った。HNE 投与の 5 分前に試験溶液を単回投与 (iv volus)する方法と、もう 1 つの方法は HNE 投与の 10 分前から 70 分間、試験溶液を持続投与 (iv infusion)する方法である。

肺出血抑制率 (%)は次式に従って算出した。尚、式中 A, B, C は前記の値を意味するものとする

$$\text{肺出血抑制率 (\%)} = [1 - (C - A) / (B - A)] \times 100$$

2-7-4-3. ハムスターLPS誘発白血球浸潤に対する抑制作用

ネンブタール麻酔下で、ハムスター (Syrian, 雄性)の頸動脈にカニューレを装着した。麻酔覚醒後、直ちにハロセン麻酔下で LPS (0.05 mg/kg, 2 ml/kg, vehicle: saline)を経口的に気管支内投与した。病態誘発 6 時間後に BALF を回収した。評価パラメータとして、BALF 中の出血を測定した。被検化合物は LPS 投与直後から BALF 採取直前まで頸動脈カニューレを通して持続注入した。(0.5 ml/hr, 6 hr)

2-7-4-4. ハムスターLPS誘発浮腫に対する抑制作用

ネンブタール麻酔下で、ハムスター (Syrian, 雄性)の頸動脈にカニューレを装着した。麻酔覚醒後、直ちにハロセン麻酔下で LPS (0.05 mg/kg, 2 ml/kg, vehicle: Saline)を経口的に気管支内投与した。病態誘発 6 時間後に肺を摘出し、湿重量を測定した。体重を共変量とみなし、湿重量を体重で補正した。被検化合物は LPS 投与直後から BALF 採取直前まで頸動脈カニューレを通して持続注入した。(0.5 ml/hr,

6 hr)

2-7-4-5. LPS/GaINショックモデルに対する生存率改善作用

動物はマウス (C3H/HeN Slc, 6-7 w, 22-25 g)を使用した。病態の誘発は D-ガラクトサミン (20 mg/mouse)と LPS (*E. Coli* O55:B5, 0.3 mg/mouse)の混液を尾静脈より投与して行った。被検物質を投与する場合、1回につき 100 mg/kg または 10 mg/kg を病態誘発直後より 2 時間間隔で 6 回腹腔内投与した。被検物質は投与直前に調整した。所定の時間にマウスの生死を確認し、24 時間後まで観察を行った。

2-7-4-6. HNEによるエラスチン分解阻害試験

10 units/ml HNE (Elastin Products Company 社)を 100 nM HEPES 緩衝液, pH7.5 (1.0 M NaCl および 0.001% Brij-35 を含む)中で被検物質と 37°C で 6 分間プレインキュベート後、20 mg/ml エラスチン (Sigma 社)と 37°C で 4 時間反応した。7.5%酢酸溶液を添加して反応停止後、遠心分上清区分 (水解物)の吸光度 275 nm を測定した。(試験は 3 回実施)なお、濃度はいずれも終濃度で表した。

酵素活性は 4 時間当たりの吸光度の増加×1000 として表した。またIC₅₀値は平均値で表示し、統計処理ソフトウェアであるSASシステムを用い、4 パラメータロジット関数、非線型最小 2 乗法で回帰することにより算出した。

2-7-4-7. AE-3763 の各種酵素に対する阻害活性試験

AE-3763 について、HNE と酵素学的、生理学的に関連するプロテアーゼを中心に以下の酵素について、自動法 (TBA-60R)あるいは用手法により測定した。

1) Neutrophil Cathepsin G (自動法)

2 units/ml ヒト好中球 Cathepsin G (EPC 社)を 100 mM HEPES 緩衝液, pH7.5 (1.0 M NaCl および 0.001% Brij-35 を含む)中で被検物質と 37°C で 4 分間プレインキュベート後、0.5 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (Sigma 社)と 37°C で 3 分間反応し、水解物 *p*-nitroaniline の生成速度 (吸光度 404 nm)で測定した。

2) Trypsin (自動法)

0.01 units/ml ウシ心臓 Trypsin (Worthington社)を 35 mM トリス・塩酸緩衝液, pH8.0 (14 mM CaCl₂および 0.1% PEG6000 を含む) 中で被検物質と 37°C で 6 分間プレインキュベート後、0.2 mM Benzoyl-Ile-Glu-(OR)-Gly-Arg-*p*-nitroanilide (第一化学薬品)と 37°C で 3 分間反応し、水解物 *p*-nitroaniline の生成速度 (吸光度 404 nm)で測定した。

3) Thrombin (自動法)

0.08 units/ml ヒト血漿 Thrombin (Sigma 社)を 38 mM トリス・塩酸緩衝液, pH8.0 (75 mM NaCl, 16 mM EDTA・4Na および 0.08% PEG6000 を含む) 中で被検物質と 37°C で 6 分間プレインキュベート後、0.2 mM H-D-Phe-piconyl-Arg-*p*-nitroanilide (第一化学薬品)と 37°C で 3 分間反応し、水解物 *p*-nitroaniline の生成速度 (吸光度 404 nm)

で測定した。

4) Plasmin (自動法)

0.01 units/ml ヒト血清 Plasmin (Sigma 社)を 35 mM トリス・塩酸緩衝液, pH8.0 (105 mM NaCl, 0.5% グリセリンおよび 0.1% PEG6000 を含む) 中で被検物質と 37°C で 6 分間プレインキュベート後、0.2 mM H-D-Val-Leu-Lys- *p*-nitroanilide (第一化学薬品)と 37°C で 3 分間反応し、水解物 *p*-nitroaniline の生成速度 (吸光度 404 nm)で測定した。

5) Chymotrypsin (用手法)

7.3 units/ml ウシ膵 Chymotrypsin (Worthington 社)を 73 mM トリス・塩酸緩衝液, pH8.0 (15 mM CaCl₂, 0.1% PEG6000 および 20% メタノールを含む) 中で被検物質と 37°C で 5 分間プレインキュベート後、0.1 mM Suc-Phe-*p*-nitroanilide (フナコシ)と 37°C で 6 分間反応し、7.5% 酢酸を添加後、水解物 *p*-nitroaniline の生成速度 (吸光度 404 nm)で測定した。

6) *P. aeruginosa* Elastase (用手法)

0.5 m units/ml ヒト好中球 *P. aeruginosa* Elastase (EPC 社)を 44 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)中で被検物質と 37°C で 5 分間プレインキュベート後、1.7% カゼイン溶液と 37°C で 10 分間反応した。沈殿試薬を添加して反応停止後、濾過し、水解物の吸光度 275 nm を測定した。

7) Thermolysin (用手法)

0.4 μg/ml Thermolysin (ナカライテスク 社)を 44 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)中で被検物質と 37°C で 5 分間プレインキュベート後、1.7% カゼイン溶液と 37°C で 10 分間反応した。沈殿試薬を添加して反応停止後、濾過し、水解物の吸光度 275 nm を測定した。

8) Cathepsin D (用手法)

0.1 units/ml ウシ膵 Cathepsin D (Sigma 社)を 40 mM 乳酸 (pH3.5) 中で被検物質と 37°C で 5 分間プレインキュベート後、1.8%ウシ血漿ヘモグロビン溶液と 37°C で 10 分間反応した。沈殿試薬を添加して反応停止後、濾過し、水解物の吸光度 275 nm を測定した。

9) Pepsin (自動法)

50 μg/ml ブタ胃粘膜 Pepsin (Sigma 社)を 242 mM ホウ酸-水酸化ナトリウム緩衝液 (pH9.7)中で被検物質と 37°C で 5 分間プレインキュベート後、0.2 mM Acetyl-Phe-diiodotyrosine と 37°C で 5 分間反応した。生成した Diiodotyrosine は、0.0078% *o*-Phthalaldehyde および 1.55 mM N-Acetylcysteine と反応させ、吸光度 340 nm で測定した。

10) Phospholipase A₂ (Pancreatic) (自動法)

4.0 units/ml ブタ膵臓 Phospholipase A₂ (Sigma 社)を 200 mM トリス・塩酸緩衝液, pH8.0 (5 mM CaCl₂ および 0.05 mg/ml BSA を含む)中で被検物質と 37°C で 5 分間プレインキュベート後、0.1 mM 2-Hexadecanoylthioethane-1-phosphocholine と 37°C で

6 分間反応した。水解物 Thioglycylphosphorylcholine は、1.0 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))との反応物 TNB (Thionitrobenzoate)の生成速度 (吸光度 416 nm)を測定した。

11) Phospholipase A₂ (Snake venom) (自動法)

1.5 m units/ml Snake venom Phospholipase A₂ (Sigma社)を 200 mM トリス・塩酸緩衝液, pH8.0 (5 mM CaCl₂および 0.05 mg/ml BSAを含む)中で被検物質と 37°Cで 5 分間プレインキュベート後、0.1 mM 2-Hexadecanoylthioethane-1-phosphocholineと 37°Cで 6 分間反応した。水解物 Thioglycylphosphorylcholine は、1.0 mM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid))と反応させ、TNB (Thionitrobenzoate)の生成速度 (吸光度 416 nm)を測定した。

12) Acetylcholinesterase (自動法)

15 m units/ml 電気ウナギ Acetylcholinesterase (Sigma社)を 100 mM リン酸緩衝液, pH8.0 (0.6 mM NaHCO₃および 0.1 mg/ml BSAを含む)中で被検物質と 37°Cで 5 分間プレインキュベート後、1.0 mM Acetylcholineと 37°Cで 4 分間反応した。水解物 Thiocholineは 0.33 nM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) と反応させ、TNB (Thionitrobenzoate)の生成速度 (吸光度 416 nm)を測定した。

13) Butyrylcholinesterase (自動法)

10 m units/ml ウマ血清 Butyrylcholinesterase (Sigma社)を 100 mM リン酸緩衝液, pH8.0 (0.6 mM NaHCO₃および 0.1 mg/ml BSAを含む)中で被検物質と 37°Cで 5 分間プレインキュベート後、2.0 mM Butyrylcholineと 37°Cで 4 分間反応した。水解物 Thiocholineは 0.33 nM DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)) と反応させ、TNB (Thionitrobenzoate)の生成速度 (吸光度 416 nm)を測定した。

2-8. 参考文献

1. Kawabata, K.; Suzuki, M.; Sugitani, M.; Imaki, K.; Toda M.; Miyamoto, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, 177, 814.
2. (a) Edwards, P. D.; Meyer, E. F.; Vijayalaskshmi, J.; Tuthill, P. A.; Andisik, D. A.; Gomes, B.; Strimpler, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 1854; (b) Edwards, P. D.; Wolanin, D. J.; Andisik, D. W.; Davis, M.W. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 76; (c) Edwards, P. D.; Zottola, M. A.; Davis, M.; Williams, J.; Tuthill, P. A. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 3972.
3. Sato, F.; Inoue, Y.; Omodani, T.; Shiratake, R.; Honda, S.; Komiya, M.; Takemura, T. International Patent Application WO 2000/052032, 2000.
4. Edwards, P. D.; Andisik, D. W.; Bryant, C. A.; Ewing, B.; Gomes, B.; Lewis, J. J.; Rakiewicz, D.; Steelman, G.; Strimpler, A.; Trainor, D. A.; Tuthill, P. A.; Mauger, R. C.; Veale, C. A.; Wildonger, R. A.; Williams, J. C.; Wolanin, D. J.; Zottola, M. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1876.

5. Okazaki, H.; Kuromiya, A.; Kubo, T.; Imano, K.; Takemura, T.; Tsuji, J., Sato F., Komiya, M. *17th International Symposium on Medicinal Chemistry*, Barcelona, Spain 1-5 September **2002**.
6. 火山陽一、鈴木健二、藤原巖、友尾幸司、石田寿昌 日本結晶学会平成14年度年会、講演要旨集P85、演題番号：P3-I-24
7. Newman, M. S.; Cella, J. A. *J. Org. Chem.* **1974**, 39, 214.
8. Mohan, R.; Chou, Y.; Bihovsky, R.; Lumma, W. C. J.; Erhardt, P. W.; Shaw, K. J. *J. Med. Chem.* **1991**, 34, 2402.
9. Solladie-Cavallo, A.; Bencheqroun, M. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 5831.

第3章 AE-3763の工業的合成法検討について

3-1. 研究の目的

ヒト好中球エラスターゼ (HNE)が関与する組織障害の治療薬、とりわけ急性期に使用可能な注射剤の開発を目的として探索研究を行った結果、薬効、物性および安全性の面で最も優れた化合物である**AE-3763**を見出し、これを開発化合物として選択した。そこで工業的に実施可能な**AE-3763**の製法の検討を行った。

第一章・緒言でも述べたとおり、ラボスケールで実施していた**AE-3763**の合成法の大きな課題として、1) 出発物質の化合物**8**がラセミ体のため途中の中間体がすべてジアステレオマー混合物のため結晶化せず、各工程でカラム精製が必須となり、特に工程の最終段階では (*S,S,R*)-isomerとの分離が必要であった。したがって光学活性なアミノアルコールの合成法検討が必要であった。2) 最終工程で酸化剤として使用しているDess-Martin試薬 (DMP)は反応系に加えるだけで反応が進行し、カルボニル α -位のラセミ化も進行しないことからラボ合成では優れた合成法であるが、DMPそれ自身およびその中間体が激しい爆発性を有しており、パイロット合成では使用できないことから、より緩和な酸化法の検討が必要であった (**Fig.3-1**)。

以上の課題を解決することによって、**AE-3763**の工業的合成法の開発に目途をつけることが可能なことから、検討に着手した。

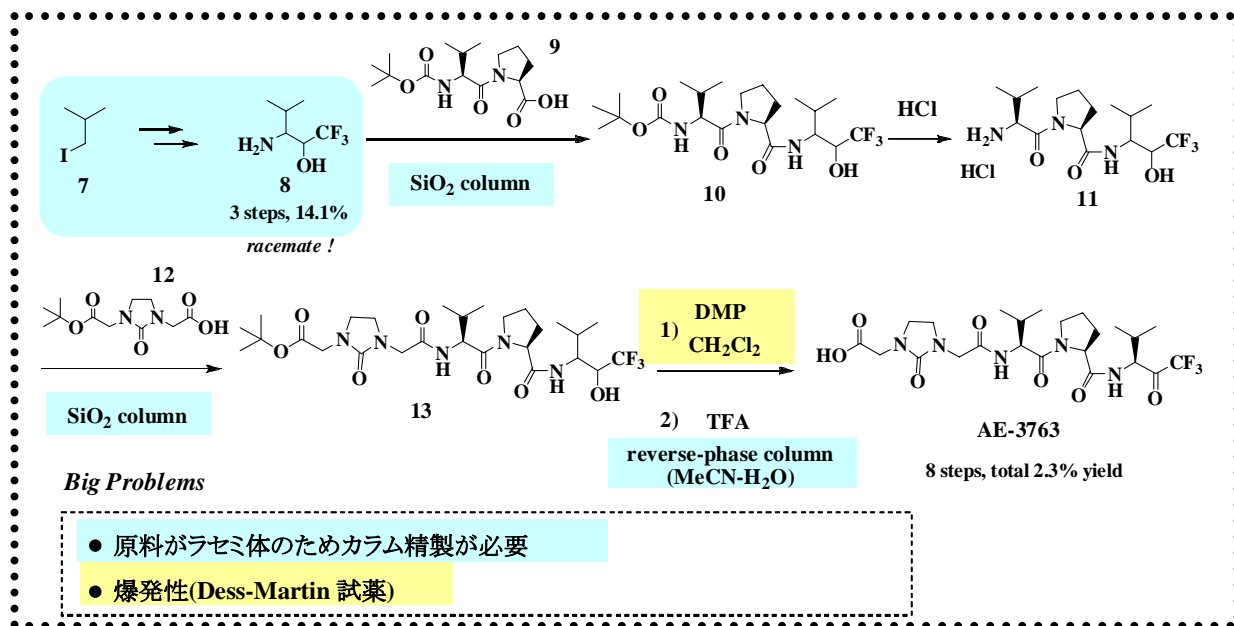


Fig. 3-1 AE-3763のラボスケールでの合成法

3-2. 光学活性アミノアルコールの製法検討

近年、トリフルオロメチルケトン基 (CF₃CO-) を有する酵素阻害剤について、安定性や阻害メカニズムなどの点から興味もたれ、創薬を目的とした合成研究が多数報告されている¹⁾。3-amino-1,1,1-trifluoromethyl-4-methyl-2-pentanol **8**の合成

例も多数報告されている²⁾ が、ほとんどがラセミ体での合成で、光学活性体の合成はVeale³⁾らの他数例報告されているにすぎない。しかもこのVealeらの方法は工程数が長いだけでなく、ラセミ体を原料としているため途中で光学分割を行う必要があり、全収率が低く(7 steps, overall yield 2.7%)工業的製法として満足できるものではなかった (Fig. 3-2)。

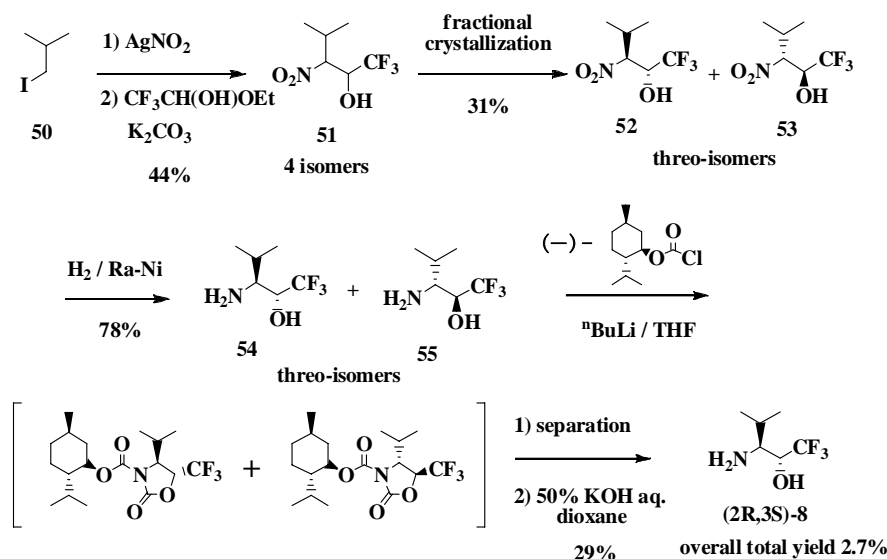


Fig. 3-2 Veale³⁾らの合成法

また2004年にAndresらから、*N*-ジベンジルアルデヒドと trifluoromethyl trimethylsilane (Ruppert試薬, TMSCF₃)による化合物8の*N*-ジベンジル誘導体の立体選択的な合成法が報告⁴⁾されたが、(2*S*,3*S*)と(2*R*,3*S*)-isomerの生成比は84:16で両化合物の分離にはカラム精製が必要であった (Fig. 3-3)。AE-3763の合成を行うためには光学活性で晶析可能な化合物8の誘導体が鍵中間体となることから、この化合物の高収率かつ立体選択的で、かつカラム精製を必要としない合成法の研究を開始した。

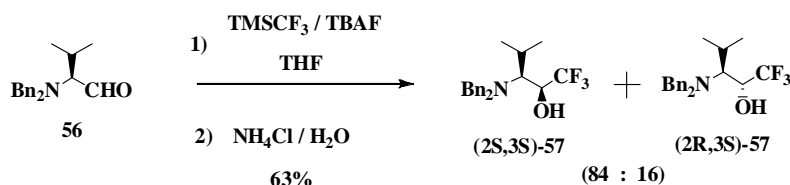


Fig. 3-3 Andres⁴⁾らの合成法

一般に、トリフルオロメチルアミノアルコール体を合成する方法として、アミノ酸のカルボキシル基をアルデヒドへと変換後、F⁻触媒存在下TMSCF₃と処理することにより対応するアミノアルコール体を得る方法が知られている⁵⁾ (Fig. 3-4)。

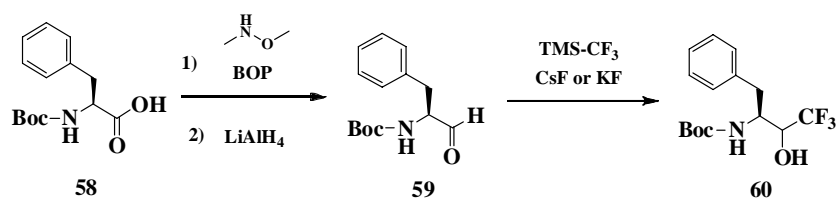
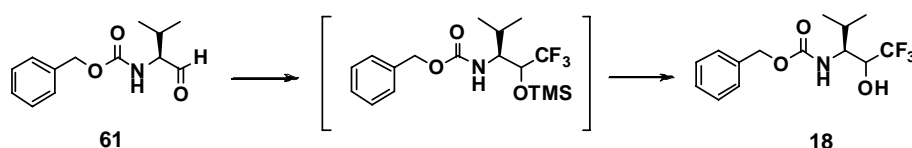


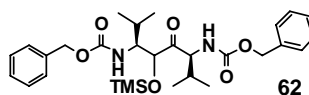
Fig. 3-4 トリフルオロメチルアミノアルコール体の合成例⁵⁾

しかしアミノ酸の種類によって反応性にバラツキがあり、特にValのような立体障害の大きなアミノ酸を用いると、アルデヒド**61**からアミノアルコール**18**への反応が全く進行しないことがわかった(**Table 3-1**)。

Table 3-1 アルデヒド**61**のアミノアルコール**18**への変換検討



No.	条件	結果
1.	TMS-CF ₃ (1.2eq.) / cat.TBAF / THF	many spots
2.	TMS-CF ₃ (1.2eq.) / TBAF(1.2eq.) / THF	many spots
3.	TMS-CF ₃ (3eq.) / TBAF(3eq.) / THF	many spots
4.	TMS-CF ₃ (3eq.) / KF(3eq.) / THF	no reaction
5.	TMS-CF ₃ (3eq.) / CsF(3eq.) / THF	BnOH 生成
6.	TMS-CF ₃ (2eq.) / cat.TBAF / THF	62 生成
7.	TMS-CF ₃ (2eq.) / toluene / reflux	no reaction
8.	TMS-CF ₃ (2eq.) / cat.TBAF / toluene / reflux	many spots



一方、Walterら⁶⁾はValから*N*-Boc-oxazolinone **16**を経由し、化合物**16**へのTMSCF₃の付加と脱TMS化によって化合物**14**の合成を行ったことを報告した。ここで、化合物**14**がヘミアセタール構造を有する点に着目し、これを還元後、脱保護することによって、目的とする光学活性な化合物**8**が得られると考えられたことから (**Fig. 3-5**)、化合物**14**のアミノ保護基をより安定で安価なCbz基に変換した化合物**15**を合成し、検討を行った。

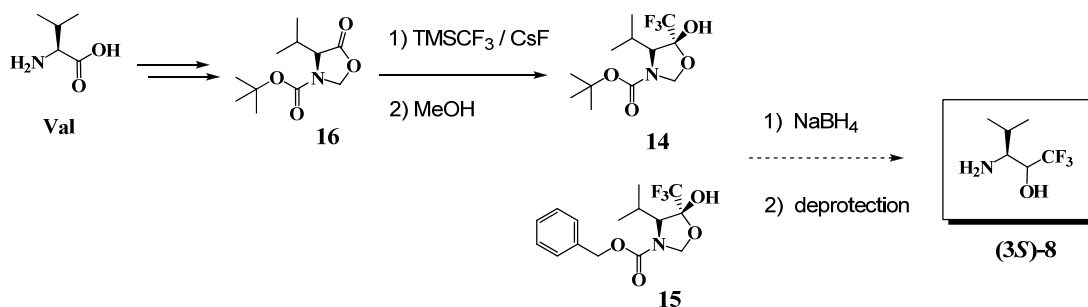


Fig. 3-5 光学活性な化合物**8**の合成戦略

まず、化合物**15**を合成し、NaBH₄で還元したところ、低収率ながら目的とする化合物**18**が得られた。しかし、この反応について詳細に検討したところ化合物**15**から直接化合物**18**が得られるのではなく、一旦開環体の化合物**15a**が還元されて化合物**17**が生成し、その後*N*-ヒドロキシメチル基が加水分解されることによって化合物**18**が得られることがわかった (Fig. 3-6)。

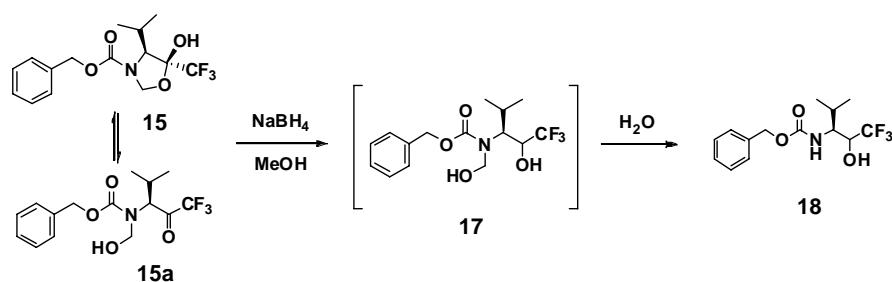


Fig. 3-6 化合物**18**の合成

したがって、化合物**17**の加水分解反応を効率良く行うためにNaBH₄/エタノールで還元後、反応液にK₂CO₃溶液を加えアルカリ加水分解をおこなった。まず、化合物**15**の還元によって(2*S*,3*S*)-**17a**と(2*R*,3*S*)-**17b**がほぼ1:1の生成比で得られることをHPLCで確認後、続いてアルカリ加水分解を行うと、(2*S*,3*S*)-**18a**と(2*R*,3*S*)-**18b**が3:1の比で得られ、その他副生成物として化合物**19**およびベンジルアルコールが得られる結果となった。(Fig. 3-7)

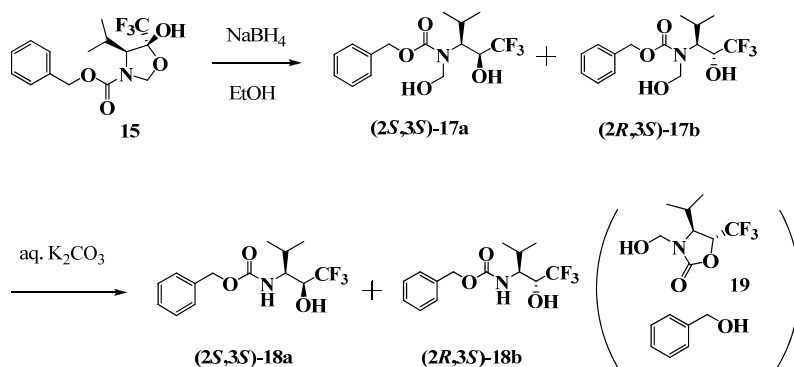


Fig. 3-7 化合物**18**の合成と化合物**19**の副生

副生成物の化合物**19**の推定生成機構を**Fig. 3-8**に示す。すなわち(2*S*,3*S*)-**17a**から化合物**20**が生成するためには、イソプロピル基とトリフルオロメチル基の立体反発のため、(2*R*,3*S*)-**17b**の場合と比較して困難であると思われる。したがってトリフルオロメチルアルコールのカルボニル基への求核反応は進行せずに、ヒドロキシメチル基の加水分解反応が優先し、(2*S*,3*S*)-**18a**が選択的に得られる。一方(2*R*,3*S*)-**17b**の場合は立体的に安定な構造をとるため、ヒドロキシメチル基の加水分解反応だけでなくトリフルオロメチルアルコールのカルボニル基への求核反応も同時に進行し、化合物**19**およびベンジルアルコールが副生するものと推定される (**Fig. 3-8**)。

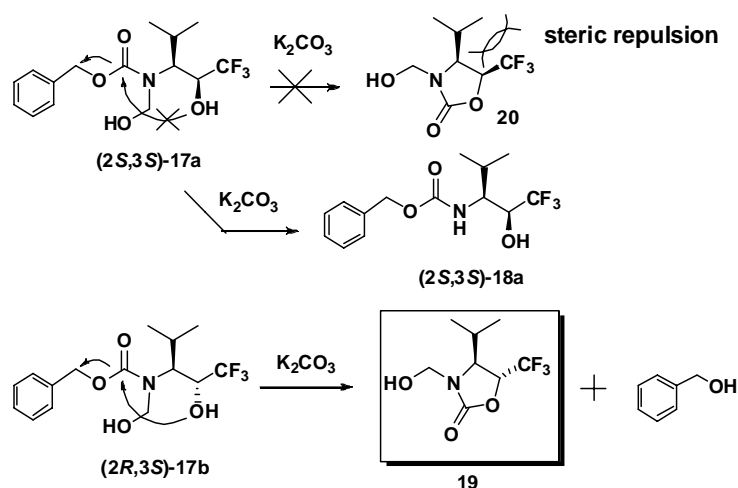


Fig. 3-8 化合物**19**の推定生成機構

更に、(2*S*,3*S*)-**18a**は結晶化が可能なことから、この工程で再結晶を行うことでラム精製が不要になるが、(2*R*,3*S*)-**18b**は結晶化しないことに加え、副生した化合物**19**やベンジルアルコールが不純物として混在している場合、晶出が困難になり、その結果収率も低下する。したがって還元反応の立体選択性を向上させることで、(2*S*,3*S*)-**18a**の収率、純度の向上が見込めることから、還元反応の検討を行った。

まず、還元剤を $NaBH_4$ に固定し溶媒の検討を行ったところ、*t*-ブチルアルコール、イソプロピルアルコール等嵩高い溶媒で(2*S*,3*S*)-**17a** : (2*R*,3*S*)-**17b** = 79 : 21と選択性の向上がみられた。一方、反応溶媒に水を添加すると選択性が逆転し(2*R*,3*S*)-**17b**が主成分体になることがわかった。(Table 3-2)。これらのことから化合物**15a**のヒドロキシメチル基とカルボニル基との分子内水素結合によってコンホメーションが固定化され、ハイドライドがより立体障害の少ない方から攻撃し、目的とする(2*S*,3*S*)-**17a**が優先的に得られている可能性が考えられた。(Fig. 3-9)

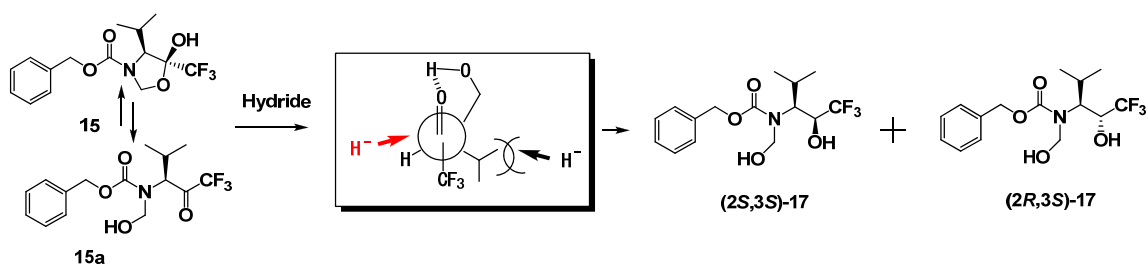


Fig. 3-9 化合物15の立体選択的還元1

Table 3-2 化合物15の立体選択的還元法の検討1

Entry	Solvent 1	Solvent 2	ratio (%) (17a:17b)	Entry	Solvent 1	Solvent 2	ratio (%) (17a:17b)
1	MeOH	-	40:60	11	DMF	H ₂ O	15:85
2	MeOH	H ₂ O	21:79	12	DMF	IPA	24:76
3	MeOH	IPA	45:55	13	DMF	<i>t</i> -BuOH	37:63
4	EtOH	-	55:45	14	THF	-	67:33
5	EtOH	H ₂ O	13:87	15	THF	H ₂ O	14:86
6	EtOH	IPA	25:75	16	THF	IPA	54:46
7	EtOH	<i>t</i> -BuOH	41:19	17	THF	<i>t</i> -BuOH	72:28
8	IPA	-	69:31	18	<i>t</i> -BuOH	H ₂ O	27:73
9	IPA	H ₂ O	28:72	19	<i>t</i> -BuOH	IPA	79:21
10	DMF	-	32:68	-	-	-	-

混合溶媒比は 1:1, (2*S*,3*S*)-17a:(2*R*,3*S*)-17b の比率は HPLC で測定

したがって、還元反応の際に酸素原子への配位能が高い金属を添加することによって、分子内水素結合より強固な環状キレート構造を形成させ、コンホメーションを固定化させることができれば更なる立体選択性の向上が期待できる。(Fig. 3-10)

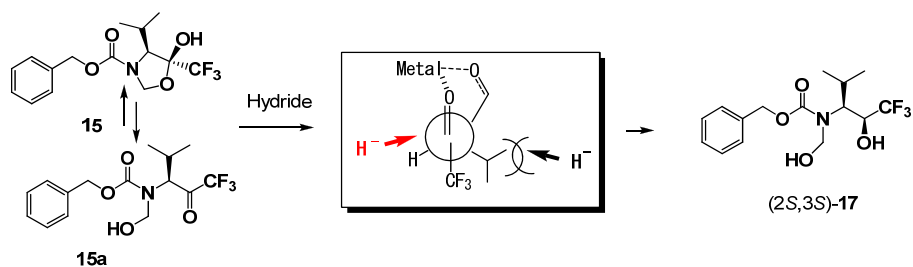


Fig. 3-10 化合物15の立体選択的還元2

そこで種々の金属試薬、還元剤、溶媒、反応温度の最適化を行った結果、添加する金属としてZnCl₂を用い、*t*-ブチルメチルエーテル中室温でNaBH₄処理することによって立体選択性が(2*S*,3*S*)-**17a** : (2*R*,3*S*)-**17b**=22 : 1 と飛躍的に向上した。また、選択性が向上したことで化合物**19**やベンジルアルコールの副生はみられなかった。続いてアルカリ加水分解後、ヘキサン-イソプロピルエーテル (3:1)より晶出を行うことによってカラム精製することなく、高純度の(2*S*,3*S*)-**18**が好収率（化合物**15**より収率87%, 純度99%以上）で得られた (Table 3-3)。

Table 3-3 化合物**15**の立体選択的還元法の検討2

Reaction scheme: Compound **15** (a bicyclic ester with a CF₃ group) reacts with NaBH₄ to form a mixture of (2*S*,3*S*)-**17a** and (2*R*,3*S*)-**17b**. This mixture then reacts with aq. K₂CO₃ to yield (2*S*,3*S*)-**18a**.

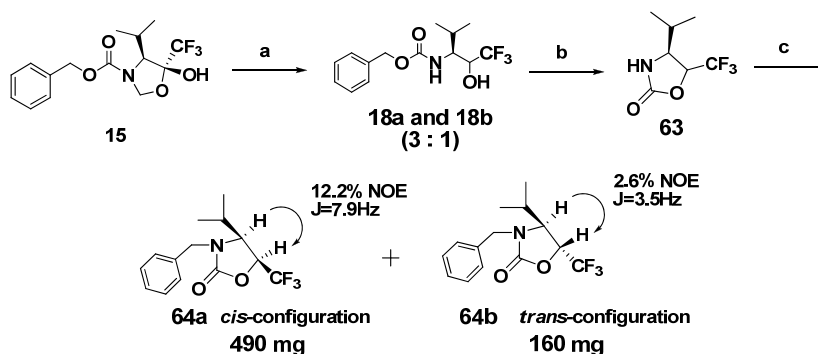
Entry	NaBH ₄ (equiv)	ZnCl ₂ (equiv)	solvent	ratio (%) (17a : 17b)	yield (%) 18a
1	1	-	IPA- <i>t</i> -BuOH	79:21	52
2	1	0.5	EtOH	NR ^c	-
3	1	0.5	THF	77:23	-
4	1	0.5	Et ₂ O	87.0:13.0	61
5	1	0.5	<i>t</i> -BuOMe	87.8:12.2	55
6	1.5	0.75	<i>t</i> -BuOMe	95.2:4.8	74
7	2	1	<i>t</i>-BuOMe	95.7:4.3	87

(2*S*,3*S*)-**17a**:(2*R*,*S*)-**17b**の比率はHPLCで測定, 化合物**18a**はhexane-IPE (3:1)より晶出

次に、この反応の最適化条件の検討を行った。その結果、

- 1) ZnCl₂とNaBH₄を10~30分攪拌し、その後化合物**15**の*t*-ブチルメチルエーテルを滴下するのが良い。攪拌時間が長くなるにしたがい、立体選択性が低下する
- 2) 攪拌温度は室温付近が良く、(20℃~30℃) 冷却あるいは加温すると立体選択性が低下する。
- 3) 反応は窒素気流下でおこない、ZnCl₂は吸湿していないものを用いる。封切後ある程度経過したもの（吸湿していると思われる）を使用すると立体選択性が低下し、反応系に少量の水を添加すると、更に立体選択性が低下することがわかった。
- 4) 晶出溶媒について、ヘキサンは静電気による火災の危険性があるため、ヘプタン-イソプロピルエーテルに変更した。

次に、(2*S*,3*S*)-**18a**の絶対構造の決定を行った。化合物**18a**と**18b**ジアステレオマー混合物を接触還元し、CDIで処理後ベンジル化し、シリカゲルカラムクロマトグラムで分離して化合物**64a**および**64b**を得た (Scheme 3-1)。化合物**64a**および**64b**の物性値は以下に示すとおりであった。



Scheme 3-1 化合物**64a**および**64b**の合成

Reagents: (a) (i) NaBH_4 , EtOH, 0 °C; (ii) aq. K_2CO_3 ; (b) (i) $\text{Pd}(\text{OH})_2\text{-C}$, H_2 , AcOEt, rt; (ii) CDI, toluene, rt; (c) BnBr , K_2CO_3 , DMF, rt

64a : 490 mg

- Mp 92~93°C
- $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -48.1 ($c=1.0$, CHCl_3)
- IR (KBr, cm^{-1}) 1751
- $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ) 7.26-7.40 (5H, m), 5.09 (1H, d, $J=15.5$ Hz), 4.65 (1H, dq, $J=7.9$, 7.5 Hz), 4.08 (1H, d, $J=15.5$ Hz), 3.70 (1H, dd, $J=7.9$, 7.5 Hz), 2.18 (1H, dqq, $J=2.1$, 7.3, 6.8 Hz), 1.10 (3H, d, $J=7.3$ Hz), 1.06 (3H, d, $J=6.8$ Hz)
- HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{NF}_3$ $[(\text{M}+\text{H})^+]$ 288.1206, found 288.1202

64b : 160 mg

- 無色油状物
- $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -15.0 ($c=1.0$, CHCl_3)
- IR (KBr, cm^{-1}) 1770
- $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3 , δ) 7.26-7.40 (5H, m), 4.93 (1H, d, $J=15.3$ Hz), 4.40 (1H, dq, $J=3.5$, 6.3 Hz), 4.01 (1H, d, $J=15.3$ Hz), 3.62 (1H, dd, $J=3.5$, 3.4 Hz), 2.12 (1H, dqq, $J=3.4$, 7.2, 6.8 Hz), 0.89 (3H, d, $J=7.3$ Hz), 0.88 (3H, d, $J=6.8$ Hz)
- HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{O}_2\text{NF}_3$ $[(\text{M}+\text{H})^+]$ 288.1206, found 288.1201

化合物**64a**および**64b**の4位水素に弱いラジオ波を照射し、NOE差スペクトルを測定したところ、化合物**64a**および**64b**の5位水素に12.2%および2.6%のNOEが観測された。また4位と5位の水素の結合定数はそれぞれ7.9 Hzと3.5 Hzであった。これらNOEの大小および結合定数の値から、化合物**64a**はシス配位、化合物**64b**はトランス配位と結論された⁷⁾。以上の結果から、化合物**64a**を与えた化合物**18a**の絶対構造は (2*S*, 3*S*)であると決定した。

3-3. 酸化工程の検討

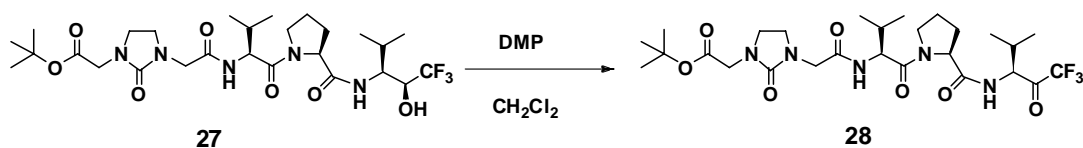


Fig. 3-11 酸化工程

ラボ合成でのトリフルオロメチルアルコールの酸化反応はDess-Martin試薬⁸⁾ (Dess-Martin periodinane, DMP) で行っていた (Fig. 3-11)。この酸化法はDMPを反応系に加えるだけで反応が進行し、不斉中心のラセミ化もおこらず、特別な温度制御も必要とせず有害な重金属も使用しないことから化合物**27**の非常に優れた酸化法⁹⁾である。しかしDMPやその中間体**66**は激しい爆発性を有しており (Fig. 3-12)、この酸化法はパイロット合成で使用できないことから、より緩和な酸化法の検討を行った。

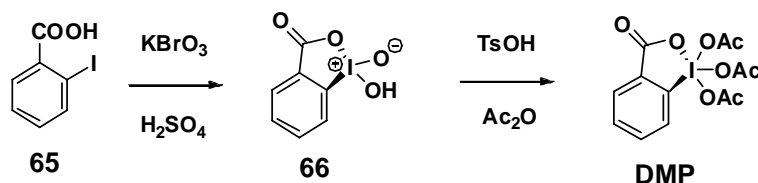
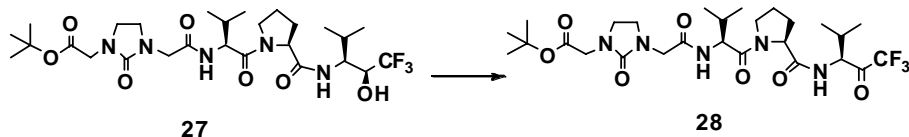


Fig. 3-12 DMPの製造法

化合物**27**の酸化法の注意点として、1点目は酸・アルカリに不安定な*t*-ブチルエステル構造を有していることであつた。化合物**27**の*t*-ブチルエステル基は酢酸などの酸やK₂CO₃などのアルカリで簡単に加水分解され、加水分解された化合物は水への溶解度が非常に高い (>1 g/ml, pH2-11)ため、回収も困難である。したがって強酸や強アルカリを触媒とした酸化法は使用できないことであつた。2点目は酸化成績体**28**のカルボニル基のα位に不斉中心があることであつた。トリフルオロメチル基で活性化されたカルボニル基のα-位に不斉中心があるため、酸化成績体**28**は異性化しやすく。異性体が多く生成すると最終物である**AE-3763**の収率、純度に大きな影響を与えるため、異性化が起こる酸化法は使用できないことであつた。

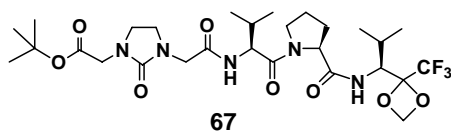
まず、KMnO₄による酸化法¹⁰⁾を検討した。酸、アルカリに弱い*t*-ブチルエステル構造を有していることから、相間移動触媒としてN(EtOEtOMe)₃, Bu₄NBr, 18-crown-6等を用い、ジクロロメタン中で反応を行ったが反応は進行しなかった。次にDMSOによる酸化法を検討した。DMSOの活性化剤に(COCl)₂ (swern酸化), SO₃-ピリジン, P₂O₅を用いて反応をおこなった¹⁰⁾。その結果DMSOの活性化剤にP₂O₅を用いると反応は6時間で完結し収率が60%で目的とする化合物**28**が得られた。(Table 3-4)

Table 3-4 化合物**27**の酸化法の検討1



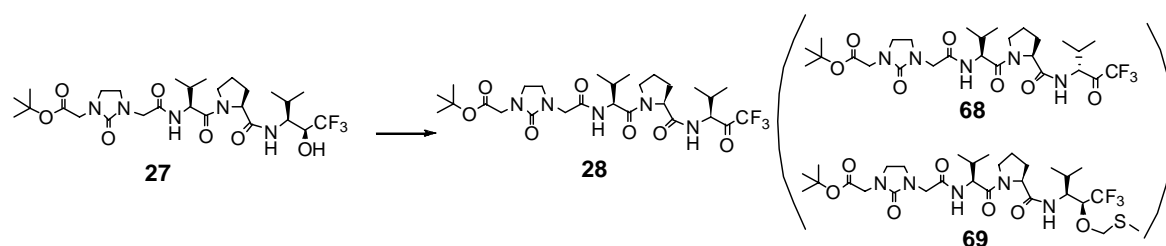
条件	結果
1. $\text{KMnO}_4 / \text{N}(\text{EtOEtOMe})_3 / \text{CH}_2\text{Cl}_2$	N.R.
2. $\text{KMnO}_4 / \text{Bu}_4\text{NBr} / \text{aq. NaOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$	N.R.
3. $\text{KMnO}_4 / 18\text{-crown-6} / \text{aq. NaOH} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$	N.R.
4. $\text{DMSO} / (\text{COCl})_2 / \text{Et}_3\text{N} / \text{CH}_2\text{Cl}_2$	N.R.
5. $\text{DMSO} / \text{SO}_3\text{-pyridine}$	反応遅い
6. $\text{DMSO} / \text{P}_2\text{O}_5 / \text{DMF}$	60%

次に同条件をスケールアップして反応を行った (210 g)。終夜攪拌後、反応を TLC で確認し、原料がわずかに残存しているように見えたため DMSO を追加し、さらに終夜攪拌した。ところが、反応を TLC で確認したところ、反応開始時には原料と思っていたスポットが増加したため、種々の展開溶媒で反応を確認したところ、原料と生成物の間に新たなスポットが生成していることが判明した。そこでこの不純物を単離したところ、その構造は下に示す構造であることがわかった。



不純物 **67** は一旦生成した化合物 **28** に *N, N*-ジメチルホルムアミド由来のホルムアルデヒドが作用して生成するものと推定された。しかしそのメチレンアセタール構造は酸に不安定で、次工程のTFAによる加水分解によりケトン体に変換され、最終物の純度には影響を与えないことがわかった。また反応は室温で行え、収率も 70~80%程度で、試薬のP₂O₅やDMSOは安価なことから、この酸化法は大量合成に向けた酸化法であると思われる。ところがP₂O₅は極吸湿性の結晶で取り扱いにくく、さらに発火性がありパイロット合成では使用できないことから、再度新しい酸化法の検討を行った。

Table 3-5 化合物**27**の酸化法の検討2



条件	結果
1) wet-Al ₂ O ₃ / Oxone / CH ₂ Cl ₂ / rt	no reaction
2) wet-Al ₂ O ₃ / Oxone / CH ₃ CN / rt	other product 生成
3) 30% H ₂ O ₂ / Na ₂ WO ₄ / [CH ₃ (C ₈ H ₁₇) ₃ N] · HSO ₄ / rt	multi spot
4) TPAP / NMO / MS4A / CH ₂ Cl ₂ / rt	other product 生成、原料残
5) Ac ₂ O (40 eq.) / DMSO (60 eq.) / rt	28 : 68 = 60 : 40
6) Ac ₂ O (40 eq.) / DMSO (3→10 eq.) / rt	反応遅い、 68 も生成
7) SO ₃ -pyridine / DMSO / Et ₃ N / rt	原料残
8) SO ₃ -pyridine / DMSO / EtNi-Pr ₂ / CH ₂ Cl ₂ / rt	原料残
9) DCC / DMSO / pyridine · TFA / CH ₂ Cl ₂ / rt	By-product 69 生成 (10%)
10) EDC / DMSO / H ₃ PO ₄ / CH ₂ Cl ₂ / rt	原料残
11) EDC / DMSO / pyridine · TFA / CH ₂ Cl ₂ / rt	原料残
12) EDC / DMSO / Cl₂CHCO₂H / CH₂Cl₂ / rt	28 (収率 88%)
13) EDC / DMSO / TFA / CH ₂ Cl ₂ / rt	反応遅い
14) EDC / DMSO / TsOH / CH ₂ Cl ₂ / rt	no reaction
15) EDC / DMSO / HCO ₂ H / CH ₂ Cl ₂ / rt	no reaction
16) EDC / DMSO / CNCH ₂ CO ₂ H / CH ₂ Cl ₂ / rt	other product 生成
17) EDC / DBSO* / Cl ₂ CHCO ₂ H / CH ₂ Cl ₂ / rt	原料残
18) EDC / TMSO* / Cl ₂ CHCO ₂ H / CH ₂ Cl ₂ / rt	原料残

*DBSO: dibutyl sulfoxide; TMSO: tetramethylene sulfoxide

オキシソルや過酸、TPAPによる酸化法を検討¹⁰⁾したが、目的とする化合物 **28** は得られなかった。金属による酸化法 (Mn, Cr, Ru) は不純物や分解物が多く、残留金属や処理等の問題があった。触媒を添加した酸素酸化や陽極酸化も不純物や分解物が多く、特殊な装置が必要であった。有機化合物であるDMSOによる酸化法は条件が緩和で高収率が期待できることから、再度DMSO酸化の検討を行った。

まず、Ac₂OをDMSOの活性化剤として用いる方法を検討したところ、目的とする化合物 **28** は得られたものの、その異性体 **68** も 40%生成した。そこでDMSOの量を減じて異性化が抑制できるかどうか検討したところ、反応が遅くなり、異性体 **68** も生成する結果となった。

次にSO₃-ピリジンを活性化剤として使い、EtNi-Pr₂等の3級アミンを添加する方

法を検討したが、添加しない場合と同様反応は遅く、原料が残る結果となった。次に酸触媒を用いたDCC-DMSO酸化を検討したところ、目的とする化合物 **28** は得られたものの、同時に不純物 **69** が 10%生成する結果となった。そこでDCCをEDCに換えて、同様に酸触媒を用いたEDC-DMSO酸化を検討したところ、酸触媒としてジクロロ酢酸を用いた場合、目的とする化合物 **28** が収率 88%で得られた。またDMSOと同様にスルホキシド構造を有するDBSOやTMSOでもEDC-ジクロロ酢酸酸化法を検討したが、反応が遅く原料が残る結果となった(**Table 3-5**)。

次に、ジクロロメタンは工業的合成法では、その回収の困難さから使用できないため、EDC-DMSO-ジクロロ酢酸酸化法の反応溶媒の検討を行った(**Table 3-6**)。

Table 3-6 化合物**27**の酸化法の検討3

条件	収率 (%)	HPLC (%)	
		28	68
1) EDC (5eq.) / Cl ₂ CHCO ₂ H (5eq.) / DMSO (4eq.) / CH ₂ Cl ₂ / rt	88	94	ND
2) EDC (5eq.) / Cl ₂ CHCO ₂ H (5eq.) / DMSO: toluene (1 : 1) / rt	50	86	7.0
3) EDC (5eq.) / Cl ₂ CHCO ₂ H (5eq.) / DMSO: AcOEt (1 : 2) / rt	88	91	3.3
4) EDC (5eq.) / Cl ₂ CHCO ₂ H (5eq.) / DMSO (4eq.) / AcOEt / rt	90	92	2.5
5) EDC (5eq.) / Cl ₂ CHCO ₂ H (5eq.) / DMSO (4eq.) / THF / rt	96	93	2.5
6) EDC (5eq.) / Cl₂CHCO₂H (5eq.) / DMSO: AcOEt (1 : 2) / 0°C	90	96	ND

ND: not detected

まず、溶媒をジクロロメタンから DMSO : トルエン = 1 : 1 にかえて反応を行ったところ、収率が低下し、異性体 **68** が 7%生成した。また溶媒を DMSO : 酢酸エチル = 1 : 2 にしたところ異性体 **68** が 3.3%に低下し、DMSO を 4 eq.に減じると 2.5%に低下した。全体的に DMSO の比が多くなると異性体 **68** が多く生成する傾向がみられた。一方、反応温度を 0°C (外温) にすると溶媒が DMSO : 酢酸エチル = 1 : 2 を用いた場合でも、異性体 **68** の副生が抑制でき、収率 90%で純度 96%の化合物 **28** が得られた。以上、課題となっていた化合物 **27** の優れた酸化法を見出すことに成功した。

3-4. 他工程の改良と初回パイロット合成の実施

3-2.で立体選択的な化合物**18a**の合成法の確立と、3-3.で化合物**27**の温和で簡便な酸化法が確立できたことで、**AE-3763**の合成法として**Fig. 3-13**のルートを見出すことができた。そこで、各工程のパイロット合成に向けた改良を行った。

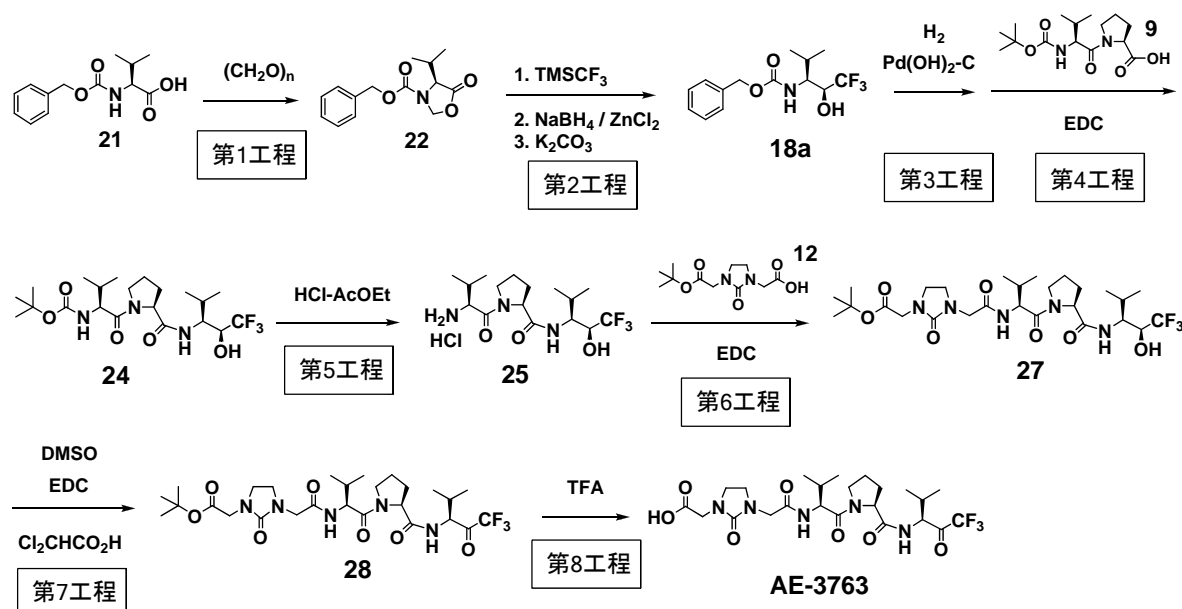


Fig. 3-13 **AE-3763**の合成ルート

○第1工程 (Fig. 3-14)

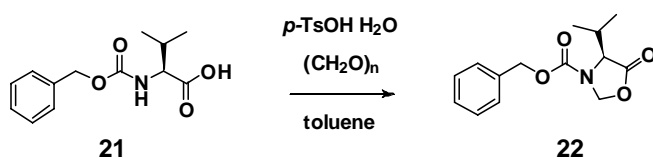


Fig. 3-14 第1工程

文献既知¹¹⁾の方法で反応は問題なく進行し、収率91%で目的とする環化体**22**を得た。しかし工業的に生産する際に、トルエンで加熱脱水還流（外温140℃）すると冷却管に白いカス状のものが付着し、洗浄が困難である問題が発生した。原因は原料のパラホルムアルデヒドが加熱によって昇華し、器壁に付着して固まったためと考えられる。そこで、その問題を解決するため、脱水還流しない方法を検討した (Table 3-7)。

Table 3-7 環化反応の検討

#	加熱温度	時間 (hr)	21 (HPLC面積%)	22 (HPLC面積%)	結果
1	脱水還流 (110°C)	1	0.22	98.54	収率91.7%
2	弱還流 (90°C以下)	直後	13.99	83.97	少量で反応
		1	3.67	95.11	
		3	1.97	97.44	収率90.9%
3	弱還流 (90°C以下)	3	4.40	94.50	大量で反応
		5	3.42	95.68	収率93.5%
4	60°C	4	0.88	98.41	少量で反応
		6	0.93	98.35	
5	60°C	2	23.07	73.81	大量で反応
		3	19.02	78.37	収率80%以下
6	50°C (MgSO ₄ 添加)	12		わずかに生成 (TLC)	
7	50°C (MS4A添加)	12		わずかに生成 (TLC)	

その結果、実験例2, 3で示すとおり、弱還流（90°C以下）下反応を行うと、5時間で反応が終了し、更にパラホルムアルデヒド由来と思われる白いカス状のものが冷却管に付着しないことがわかった。パイロット合成では75°C～85°Cで5時間、弱還流を行った。また結晶を単離する必要はなく、トルエンを減圧濃縮後そのまま次の反応をおこなっても何ら問題のないことから、パイロット合成ではトルエンを減圧濃縮した後、濃縮残渣にテトラヒドロフランを加え次工程へ進む方法を選択した。

○第3工程 (Fig. 3-15)

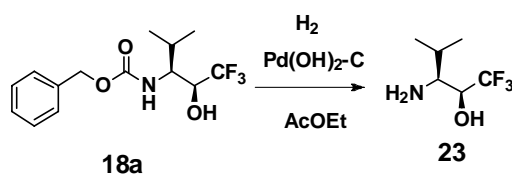


Fig. 3-15 第3工程

第3工程の接触還元触媒には20% Pd(OH)₂-Cを使用していたが、50%wet 5%

Pd-Cでも問題なく反応は進行した。また、生成物**23**は非常に昇華性が高いことから、濃縮途中でロスする危険性があったため、この工程では濃縮することなく、触媒の濾過のみを行って次反応を行うこととした。したがって反応溶媒を酢酸エチルから第4工程で使用する*N,N*-ジメチルホルムアミドに変更したところ、着色がみとめられたが、その着色は第4工程で除去できることから問題ないと考えられた。

○第5,6工程 (Fig. 3-17)

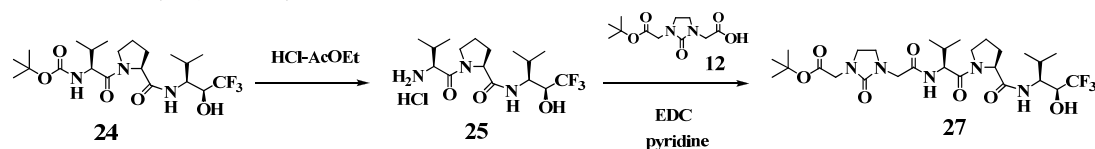


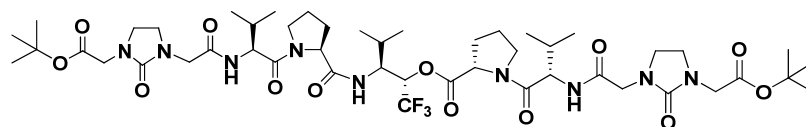
Fig. 3-17 第5, 6工程

化合物**24**を塩化水素-酢酸エチルで脱Boc化後、反応液を濃縮乾固し、濃縮残渣にイソプロピルエーテルを加えて塩酸塩を一旦固体として取り出し、そのピリジン溶液に化合物**12**とEDCを加えて縮合反応を行い、化合物**27**を得た。この2工程を通しての収率が38%と低いことから縮合反応に問題があると考え、縮合剤と反応溶媒の検討を行った。その結果、実験例8や9で示すとおり、HOBtとEt₃Nを触媒として添加し、化合物**12**に対して化合物**25**を過剰量用い、反応液を終夜攪拌後、さらにEDCを追加して反応を継続することによって収率が大幅に改善した (Table 3-10)。したがってこの反応条件を第4工程の縮合反応にも適用することとした。

Table 3-10 縮合反応の検討

#	25	12	縮合剤	HOBt	Et ₃ N	solvent	yield
1.	1eq.	1eq.	EDC (1.2eq.)	none	none	pyridine	38%
2.	1eq.	1eq.	EDC (1.0eq.)	1eq.	2eq.	AcOEt	65%
3.	1eq.	1eq.	DCC (1.0eq.)	1eq.	2eq.	AcOEt	67%
4.	1eq.	1eq.	EDC (1.0eq.)	1eq.	2eq.	DMF	68%
5.	1eq.	1eq.	DCC (1.0eq.)	1eq.	2eq.	DMF	61%
6.	1.1eq.	1eq.	EDC (1.2eq.)	1eq.	2eq.	DMF	78%
7.	1.2eq.	1eq.	EDC (1.2eq.)	1eq.	2eq.	DMF	81%
8.	1.3eq.	1eq.	EDC (1.2eq.+0.2eq)	1eq.	2eq.	DMF	93%
9.	1.1eq.	1eq.	EDC (1.4eq.+0.2eq)	1eq.	2eq.	DMF	90%

一方、収率は向上したものの得られた化合物**27**中に不純物**73**が8.3%程度含有していることがわかった。不純物**73**は、化合物**24**中の不純物が、酸により脱Boc化された後、化合物**12**との縮合反応により生成するものと考えられる。

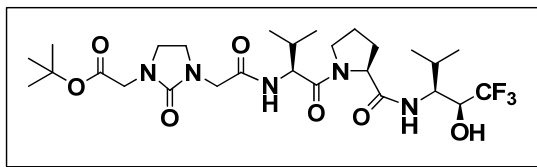


73

そこで結晶化による不純物**73**の除去を検討した。その結果、回収率、純度等を勘案すると、トルエン結晶化が最も効果的であった(**Table 3-11**)。更に、EDCを追加し反応を継続すると、不純物**73**の含量も増加傾向にあることから、パイロット合成ではEDCの追加を行わないこととした。

また第5工程の脱Boc化反応で、ラボスケールでは化合物**25**を塩酸塩としてイソプロピルエーテル処理を行って一旦単離していたが、塩酸塩は吸湿性で取り扱いにくいことからアミンのフリー体として取り出せないかどうか検討した。化合物**24**を塩化水素-酢酸エチルで脱Boc化後、NaOH水溶液で中和して析出した固体を濾取し冷水で洗浄した。収率は82%であったがろ過性が極めて悪く、又ある程度水に溶解するため中和、水洗の工程でのロスが考えられた。更に酢酸エチルに溶解しにくいため中和後酢酸エチル抽出ができないことから、フリー体を単離する検討は断念し、パイロット合成では塩化水素-酢酸エチルの反応液を減圧濃縮後、そのまま次の第6工程へと進む方法を選択した。

Table 3-11 結晶化による化合物**27**中の不純物**73**除去検討



27 各2g使用

No.	solvent 1	solvent 2	回収率 (%)	73 (%)
1.	none	none	—	8.3
2.	AcOEt (× 4.5)	IPE (× 10)	70	5.8
3.	AcOEt (× 4.5)	Et ₂ O (× 15)	析出量少ない	—
4.	AcOEt (× 4.5)	n-hexane (× 10)	沈殿析出	—
5.	acetone (× 3)	IPE (× 10)	70	8.0
6.	acetone (× 2)	Et ₂ O (× 10)	70	5.8
7.	acetone (× 3)	n-hexane (× 10)	沈殿析出	—
8.	MEK (× 4.5)	IPE (× 10)	65	9.2
9.	MEK (× 4.5)	Et ₂ O (× 10)	析出量少ない	—
10.	MEK (× 4.5)	n-hexane (× 10)	析出量少ない	—
11.	EtOH (× 5)	H ₂ O (× 1.5)	オイル析出	—
12.	CH ₃ CN (× 3)	IPE (× 15)	65	6.1
13.	CH ₃ CN (× 2.5)	IPE (× 10)	80	7.1
14.	CH ₃ CN (× 3)	Et ₂ O (>× 25)	析出せず	—
15.	CH ₃ CN (× 5)	IPE (>× 25)	析出せず	—
16.	toluene (× 7.5)	—	80	4.7
17.	toluene (× 10)	—	75	3.9
18.	toluene (× 15)	—	60	3.6

○第8工程 (Fig. 3-18)

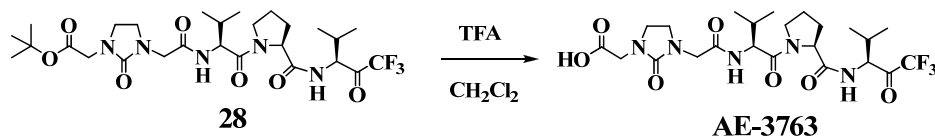
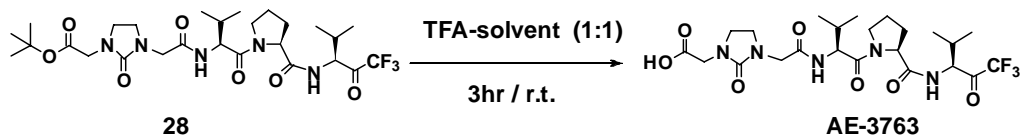


Fig. 3-18 第8工程

ラボスケールではこの反応はジクロロメタン中で行っていた。ところが、ジクロロメタンはパイロット合成で使用できないため反応溶媒の探索を行った(**Table 3-12**)。

Table 3-12 TFAによる化合物**28**の加水分解条件の検討

solvent	28 : AE-3763	不純物 (%)
1. AcOEt	30% : 49%	16.0
2. acetone	60% : 36%	1.2
3. THF	70% : 22%	1.8
4. TFA	0% : 92%	0.8
5. IPE	19% : 73%	1.3
6. toluene	0% : 94%	1.8
7. CH ₂ Cl ₂	0% : 93%	1.0

その結果、TFA単独及びトルエンを用いた場合、ジクロロメタンとほぼ同程度の結果が得られた。ここでTFA単独で反応を行った場合、濃縮に時間がかかり、さらに留去しきれず残存したTFAが**AE-3763**の結晶化に影響を与える（結晶が晶出しにくい）のに対し、トルエンを用いると共沸効果が期待できることからTFAとトルエンの混合溶媒を選択した。

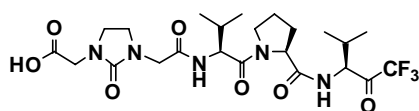
次にトルエンとTFAの混合比率について検討した。その結果、反応時間はかかるものの(46 hr)、トルエン：TFA=5：1まで比率を下げる事が可能であった。

次にスケールアップして反応を行った。500 gの化合物**28**をトルエン：TFA=5：1 (3.5 L)中室温で40時間攪拌したが原料が消失しなかった。一方、トルエン：TFA=3：1 (3.5 L)では40時間で終了したことから、トルエン：TFA=3：1が適当であると考えられた。

次にTFA以外の酸触媒について検討した。硫酸、塩酸、*p*-トルエンスルホン酸等は副生成物が多く生成し、酢酸は室温では反応しなかったので加熱するとcomplex mixtureとなった。一方、蟻酸はTFAと同様に反応が進行したが、結晶を晶出させることはできなかった。デキャンタ操作を行えば結晶が晶出したが、パイロット合成では困難なことから断念した。

○AE-3763の結晶化検討

AE-3763の結晶化方法について検討した(Table 3-13)。

Table 3-13 AE-3763の結晶化条件検討**AE-3763**

solvent	溶媒量	回収率 (%)	純度 (%)	晶出方法
1. AcOEt-MeOH (1:1)		晶出せず		
2. AcOEt-EtOH (1:1)		晶出せず		
3. AcOEt-trace MeOH		晶出せず		
4. AcOEt-trace EtOH		晶出せず		
5. AcOEt-acetone (1:1)		晶出せず		
6. AcOEt-MEK (1:1)	× 4	65	99.6	1hr (撈拌)
7. AcOEt	× 5	79	99.5	1hr (撈拌)
8. AcOEt	× 5	80	99.4	O.N. (撈拌)
9. AcOEt	× 10	70	99.5	1hr (撈拌)
10. AcOEt	× 10	77	99.4	O.N. (撈拌)

反応液を濃縮乾固後、濃縮残渣に直接溶媒を加えても晶出しにくい。そこで再結晶する前に、イソプロピルエーテルを加え終夜撈拌して粗結晶を析出させ、得られた粗結晶を再結晶の検討に用いた。ここでこの撈拌が不十分であるとアメ状物質が残り、ろ過の際そのアメ状物質が吸湿してベトベトになってしまうことから、十分撈拌することが重要である。その結果、酢酸エチルと酢酸エチル：メチルエチルケトン=1：1の場合に高純度の**AE-3763**が得られた。酢酸エチルとメチルエチルケトンの比率に関しては、純度、回収率に関してそれ程差のない結果が得られた。

以上、ラボスケールでの合成法を改良した方法で、初回パイロットスケールでの合成を実施した。(Fig. 3-19)

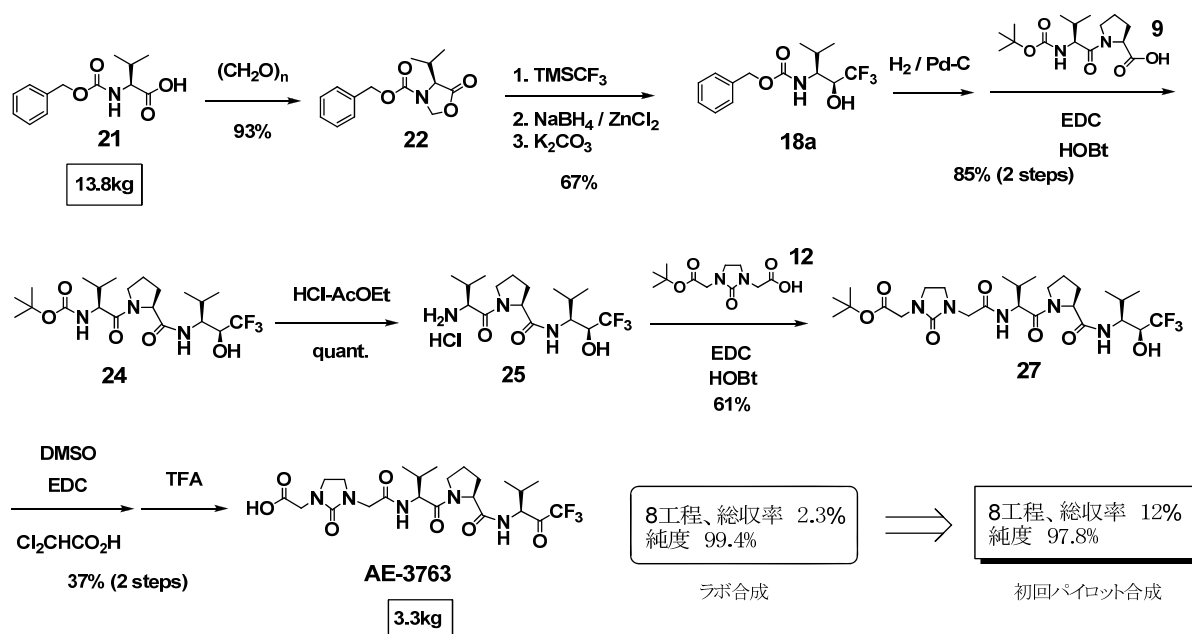


Fig. 3-19 初回パイロット合成法

その結果、カラムレスでZ-Valから総収率12%とラボスケールでの合成法と比較して収率の改善はみられたものの、**AE-3763**の純度が97.8%と低下する結果となった。初回パイロットスケールでのHPLCチャート (Fig. 3-20)とその不純物の構造 (Fig. 3-21)を下に示す。

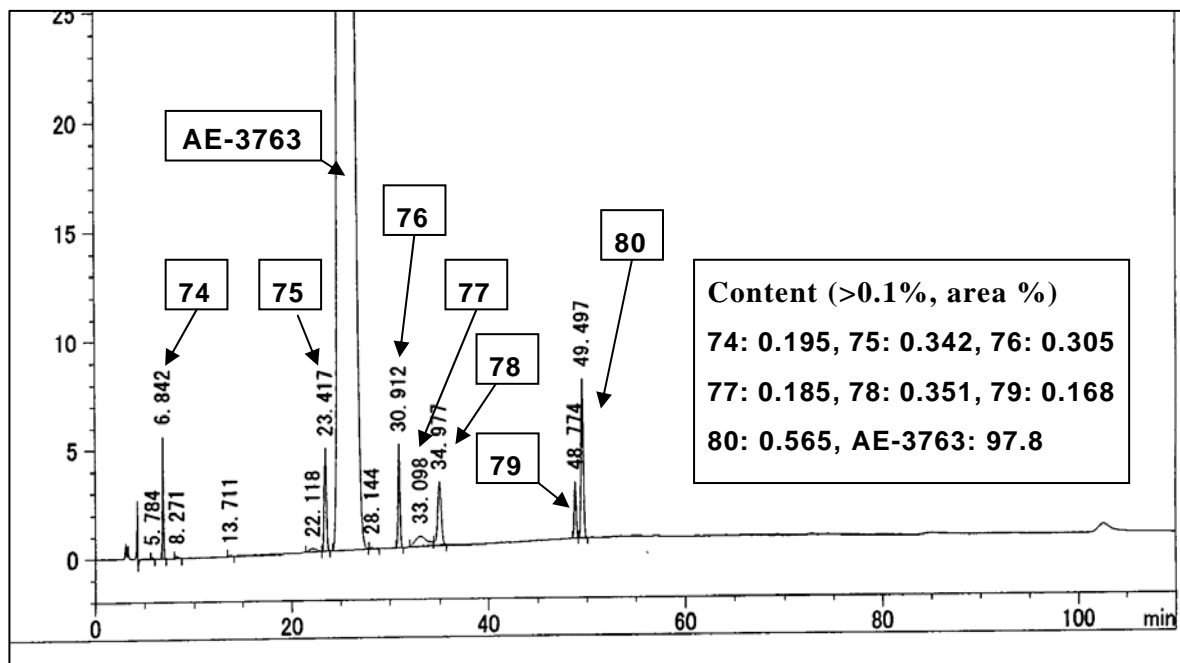


Fig. 3-20 AE-3763の初回パイロット合成品のHPLCチャート

[測定条件]

- ・ 試料溶液：本品をpH3.9リン酸・リン酸緩衝液（リン酸二水素カリウム6.8 gをHPLC用蒸留水950 mlに溶解し、リン酸でpH3.9に調整した後、水を加えて1000mlとする。）に溶解し、約2 mg/mlになるように調整する。
- ・ 検出器：紫外吸光光度計（220 nm）
- ・ カラム：J'sphere ODS-L80 (4.6 mm×250 mm, YMC社製)
- ・ カラム温度：40℃
- ・ 注入量：20 μ l
- ・ 移動相：

A：pH3.9リン酸・リン酸緩衝液/ アセトニトリル混液 (9:1)

B：pH3.9リン酸・リン酸緩衝液/ アセトニトリル混液 (4:6)

グラジエント条件

分析時間（分）	A (%)	B (%)
0	94	6
50	60	40
60	60	40
61	94	6
75	94	6

- ・ 流量：AE-3763の保持時間が約27分になるように調整する。(1.0 ml/min)
- ・ 測定時間：60分

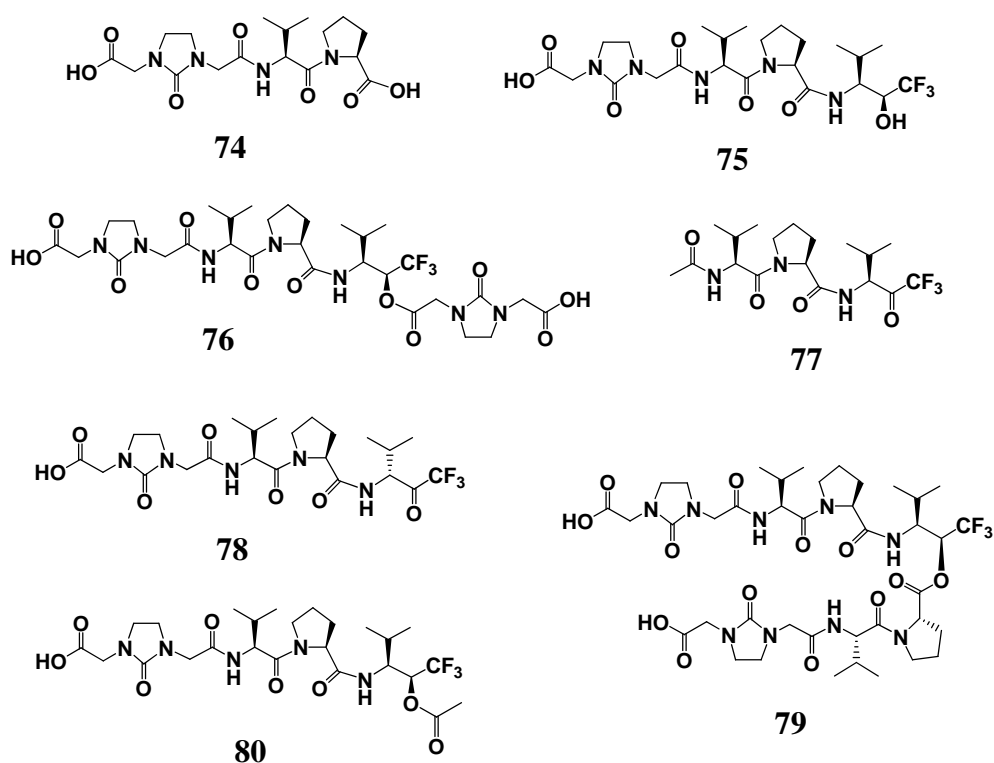


Fig. 3-21 AE-3763中の不純物74-80の構造式

尚、不純物の構造決定は、LC-MS分析を用いて不純物の構造を推定し、推定される不純物を合成して、HPLCで両者が一致すること確認することで行った。

含有量が0.1%を越える不純物が多いことから、これら不純物の生成機構を精査し、不純物の生成する原因をつきとめることによって改良合成法が確立できると考えられることから、次節で生成機構の推察とその改良合成法の検討を行った。

3-5 不純物生成機構の解明とその解決法の検討

初回パイロット合成での結果をうけて、**AE-3763** の改良合成法の検討に着手した。まず、各不純物の生成機構を推察し、原因をつきとめることによって、各不純物の生成を低減させる検討を行った。

○不純物 **74** の低減

この不純物はラボ合成では認められなかった不純物で、**AE-3763** のアミド結合がトルエン/TFA 濃縮の際、加熱により加水分解を受けて生成するものと推察された (**Fig. 3-22**)。

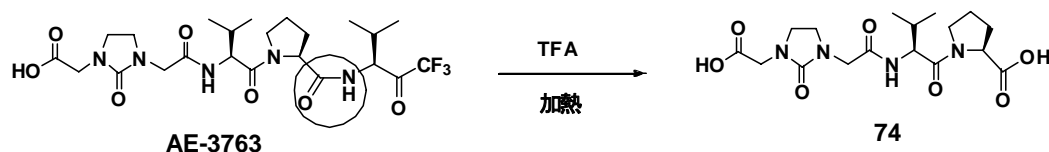


Fig. 3-22 不純物**74**の生成機構

そこで **AE-3763** の TFA 中の安定性を検討した。**AE-3763** (不純物 **74** 1.38%含有) に TFA を加え加温し、生成する不純物 **74** の経時変化を HPLC で観察した(**Table 3-14**)。

Table 3-14 **AE-3763**のTFA/加温下における安定性

条件	TFA (×0.5)	TFA (×0.5)	TFA (×1.0)	TFA (×1.0)
	45°C	60°C	45°C	60°C
0 hr	1.38%	1.38%	1.38%	1.38%
1 hr	1.58%	2.21%	1.46%	1.65%
4 hr	----	-----	1.93%	2.90%
4.5 hr	2.52%	4.94%	-----	----

その結果、**AE-3763** 濃度が高いほど、また加熱温度が高いほど経時的に加水分解を受けやすいことがわかった。したがって、トルエンよりも沸点の低い TFA のみで第 8 工程を行えば、減圧留去の時間が短縮できるものと考え検討を行った。

反応終了確認時には不純物 **74** は生成していなかった。反応液を 40～50 mmHg、45℃ 以下で減圧留去を行った。留去を始めてから 2 時間 50 分後、濃縮残渣を HPLC で確認すると不純物 **74** が 3.2% 検出され、イソプロピルエーテルで析出した粗結晶では 2.5% であった。したがって、TFA のみで反応をおこなっても不純物 **74** の生成を抑制することはできなかった。

一方、Table 3-14 の結果から、不純物 **74** の生成を減少させるための手段として、1) 濃縮時間の短縮、2) 濃縮途中での結晶化が考えられた。そこで、TFA の濃縮割合と濃縮途中でイソプロピルエーテルを加えることにより粗結晶を晶出することが可能かどうか検討を行った。その結果、60% 濃縮で濃縮を止めても、イソプロピルエーテルを同量追加すれば結晶が晶出することがわかった。しかし現状では反応機の都合上、これ以上イソプロピルエーテルを増やすことは困難であった。又、70% 濃縮では晶出するが、若干回収率が低下した。75% 濃縮では、完全濃縮とほぼ同程度の結果が得られ、不純物 **74** の生成もほぼ抑制できたことから、75% 濃縮したところで濃縮を止め、イソプロピルエーテルを加えて晶出操作を行うことで、AE-3763 中の不純物 **74** の含有量を減少させることができると考えられた。

次に工場で大量合成用に用いたドラム TFA と、試薬の TFA を比較した。AE-3763 (不純物 **74** 1.37% 含有) にドラム TFA と試薬 TFA を加えて終夜攪拌し両者を比較したところ、試薬 TFA では不純物 **74** 含量が 1.4% と変化がなかったものの、ドラム TFA では 3.7% と加水分解が進行していた。そこで両者の水分量を定量したところ、試薬 TFA は 0.02% であったのに対し、ドラム TFA は 5.5% 含水していた。ドラム TFA の成績試験書は水分 0.1% 以下となっているので、作業中に吸湿したものと思われる。実際、試薬の TFA も終夜、ふたを開放して放置しておくとも 8.1% 含水した。したがって第 8 工程を行う際、使用する TFA の水分含量を測定し、窒素気流下で反応と濃縮を行うことで AE-3763 中の不純物 **74** の含有量を減少させることができると考えられた。

○不純物 **75** の低減

不純物 **75** の生成機構として、第 7 工程の酸化反応で原料の化合物 **27** が未反応のまま反応液中に残留し、それがそのまま TFA で加水分解されて生成するものと思われた。ところが、パイロット合成では化合物 **27** 含量が 0.1% 以下であることを HPLC で確認済みの化合物 **28** を使用しているにもかかわらず、TFA で最終化合物に不純物 **75** が 0.34% 検出された。この不純物 **75** の結晶性は AE-3763 と同程度あるいはそれ以上で、再結晶で除去することが困難な化合物である。そこでその生成機構を再考したところ、Fig. 3-23 の機構が考えられた。すなわち、DMSO を用いた酸化法で生成する不純物として良く知られているプメラール転移体 **69** が酸化工程で生成し、次いで脱 *t*-ブチルエステル化工程で TFA による脱メチルチオメチルエーテル化が進行し、結果として不純物 **75** が生成するというものである。

そこでプメラール転移体 **69** を合成して化合物 **28** 中の含量を HPLC 分析で確認し

たところ、1.0%程度存在していることがわかった。したがって酸化工程でプメラ一転移体 **69** の生成を抑制することができれば **AE-3763** 中の不純物 **75** の含有量を減少させることができると考えられることから、再度酸化工程の検討を行った (**Table 3-15**)。

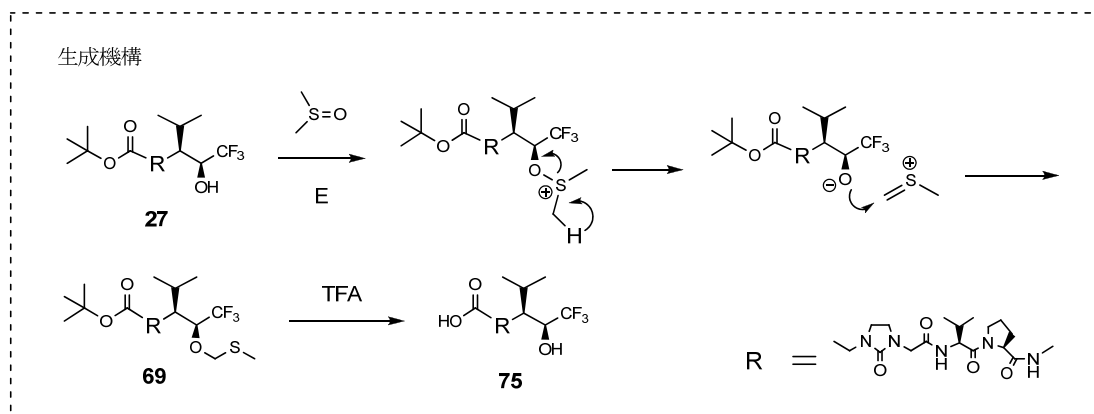
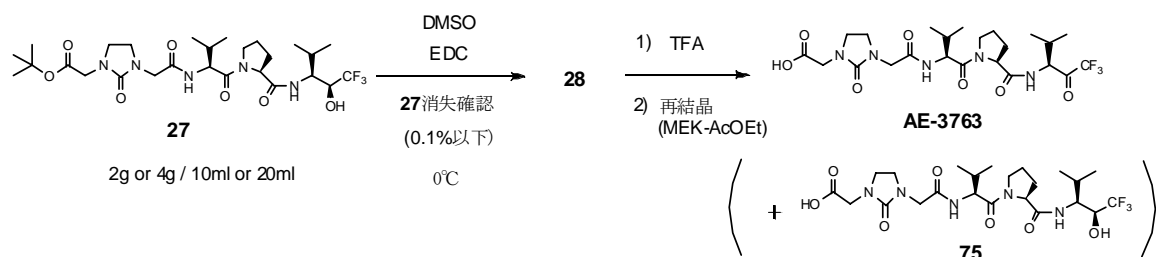


Fig. 3-23 不純物**75**の生成機構

Table 3-15 酸化工程の再検討



#	EDC (eq.)	Cl ₂ CHO ₂ H ^{a)} (eq.)	溶媒	27 ^{b)} (%)	収率 ^{c)} (%)	純度 (%)	75 ^{d)} (%)
1	5	5 (at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	N.D.	55	—	1.1
2-1	5	5 (at 0°C)	DMSO (5eq.) in DMF	1.1	—	—	—
2-2	—	2-1 に +1.2 eq.	—	1.1	—	—	—
2-3	2-2 に +1.0 eq.	—	—	0.4	—	—	—
3	5	4 (at 0°C)	DMSO (5eq.) in DMF	ND	50	97.6	0.67
4	5	3 (at 0°C)	DMSO (5eq.) in DMF	ND	57	98.80	0.37

5	5	3 (at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	ND	62	99.25	0.50
6	3	3 (at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	0.14	65	99.37	0.38
7	3	1.2 (at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	0.09	65	99.11	0.30
8	1.5	1.2 (at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	34	—	—	—
9	3	1.0 (at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	ND	62	99.58	0.23
10	3	1.0 (at -20°C → at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	ND	63	99.51	0.26
11	3	0.5 (at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	3.93	—	—	—
12-1	2.5	1.0 (at 0°C)	DMSO-AcOEt (1:2)	0.22 (3 hr)	—	—	—
12-2	12-1 に +0.5eq.	—	—	ND	—	—	—

a) ()内の温度はジクロロ酢酸滴下時の外温 b) 後処理後の化合物 **28** 中に残存する原料 **27** の含量 c) 収率は、再結晶 1 回 (MEK-AcOEt 1 回)の値 d) 再結晶後の AE=3763 中に残存する不純物 **75** の値

その結果、実験例 1 を再度注意深く観察すると、外温は氷冷下で行っているにもかかわらず、ジクロロ酢酸の滴下中に内温が 20°C まで上昇した。このことがプメラ転移体 **69** の生成、つづいて不純物 **75** の生成につながることを考えられることから、以下の反応は内温 5°C 以下になるように、滴下速度を調整して行った。まず、実験例 2, 3, 4 で溶媒を酢酸エチルから *N, N*-ジメチルホルムアミドに変更したところ、新たな不純物が観測され純度が低下した。実験例 6, 7 で化合物 **27** が完全に溶解しないうちに EDC を加えたため、当量が十分であるにもかかわらず化合物 **27** が残存した。したがって EDC を加える前に化合物 **27** の溶解を確認する必要があることがわかった。実験例 12 で EDC を 2.5 当量まで減じたが、通常 30 min. で反応が終了するところ、3 時間でも反応が終了しなかった。そこで 0.5 当量追加したところ反応は終了した。また、実験例 11 でジクロロ酢酸を 0.5 当量まで減じると、化合物 **27** が残存した。以上のことから EDC は 3 当量、ジクロロ酢酸は 1 当量必要であることがわかった。又、反応温度は内温 0~5°C で速やかに進行したが、この温度ではプメラ転移体 **69** の生成は完全には抑制できない結果となった。そこで、実験例 10 でジクロロ酢酸を -20°C 以下で滴下し、そのまま -20°C で反応さ

せたが全く反応は進行しなかった。そこで外温を 0°C まで昇温したところ反応は進行したが、プメラー転移体 **69** の生成は 0°C で滴下した時と同様結果となった。以上の検討結果から不純物 **75** の生成は完全に抑制はできないものの、酸化反応の条件は実験例 9 が最も良いと思われる。また化合物 **28** の結晶化も検討したが、晶出条件を見出すことはできなかった。またこの反応の注意点として、

- 1) ジクロロ酢酸の滴下は最後に、内温が 5°C 以下で行う。ジクロロ酢酸の滴下時に熱が発生して内温が上昇するが、上昇しすぎるとプメラー転移体 **69** の生成が増加し、**AE-3763** 中の不純物 **75** 含量が増加する傾向がみられる。
- 2) 原料の化合物 **27** が溶媒に完全に溶解したことを確認してから EDC を加える必要がある。未だ十分溶解していないにもかかわらず EDC を加えると、化合物 **27** がそれ以上溶解できず反応液中に結晶状態でそのまま残存する。
- 3) EDC の塊を良くすりつぶす必要がある。EDC の塊が残っているとその塊中に化合物 **27** がしみこみ、EDC の塊はジクロロ酢酸を添加しても均一相にはならず塊のまま残るため、化合物 **27** の消失を確認して後処理を行った化合物 **28** 中に化合物 **27** が残存する原因となる。

○不純物 **76, 77, 80** の低減

これら 3 つの不純物は第 5, 6 工程で生成していると推察された(**Fig. 3-24**)。

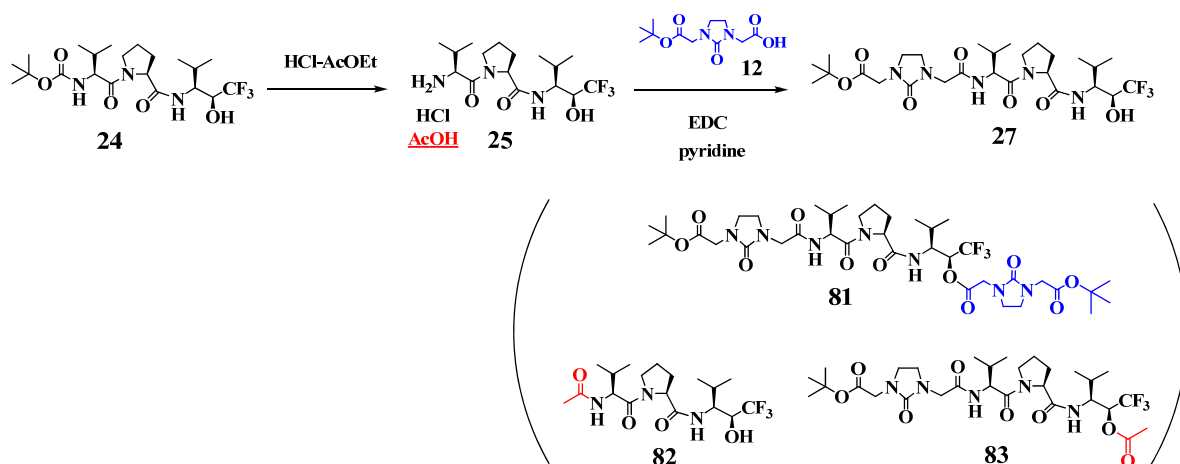


Fig. 3-24 第5,6工程

すなわち不純物 **76** は化合物 **27** と化合物 **12** が縮合して生成した不純物 **81** が TFA により加水分解されて生成するものと思われる。また不純物 **77** および **80** はアセチル基を有する構造を持つことから、第 6 工程においてアセチル化された不純物 **82** および **83** が生成し、これがその後の処理によって不純物 **77** および **80** が生成するものと思われる。そのアセチル化の原因について、第 5 工程において溶媒の酢酸エチルが塩酸により加水分解されて酢酸が生成し、第 5 工程の濃縮残渣に溶媒

と EDC, HOBt と化合物 **12** に加え、酢酸も混入したまま第 6 工程を実施するためと考えられた。又不純物 **82** が生成することにより化合物 **25** と化合物 **12** のモルバランスがくずれ、より不純物 **81** の生成を加速させていると考えられた。したがって第 5 工程は化合物 **25** を塩として取り出し、第 6 工程で化合物 **25** と化合物 **12** とのモルバランスを正確にして反応を行えば、これら 3 つの不純物は低減できると考えられた。

以上のことを考慮して、脱 Boc 化を行う酸触媒には、生成するアミン塩の結晶化が容易な *p*-トルエンスルホン酸を選択し、検討を行った(**Table 3-16**)。

Table 3-16 脱Boc化検討

24 $\xrightarrow[\text{AcOEt}]{\text{TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}}$ 26

BL-4067	TsOH·H ₂ O	AcOEt	t emp. (°C)	結果
1. 1.0g	0.45g (1.1eq.)	10 ml	r.t.	未反応
2. 1.0g	0.89g (2eq.)	10 ml	r.t.	反応遅い
3. 1.0g	1.78g (4eq.)	10 ml	r.t.	反応遅い
4. 1.0g	0.45g (1.1eq.)	10 ml	60	反応途中で原料析出
5. 1.0g	0.61g (1.5eq.)	10 ml	60	反応途中で原料析出
6. 1.0g	0.89g (2eq.)	10 ml	60	反応完結

その結果、実験例 6.の条件で脱 Boc 化が問題なく進行することがわかった。続いて化合物 **26** の結晶化について検討した。実験例 6 の反応液をそのまま成り行き室温で結晶化させたところ、回収率は 41%であった。そこで、実験例 6 の反応液にトルエンを 10 ml 加えて結晶化させたところ回収率は 78%、イソプロピルエーテル 10 ml では 87%と回収率が向上した。

続いて、この条件で得られた化合物 **26** を用い、化合物 **12** との縮合を行った。条件は、化合物 **12** を化合物 **26** に対し 0.9 当量用い、ピリジン中 EDC (1.2eq.), HOBt (0.5 eq.)で行った結果、**81**、**82** 及び **83** 等の不純物は生成せず、収率 70%で純度 99%以上の化合物 **27** が得られた。したがって化合物 **26** の *p*-トルエンスルホン酸塩を経由する方法で、不純物 **76**, **77**, **80** の生成の抑制が可能となることがわかった。

○不純物 **79** の低減

不純物 **79** はその構造から、第 4 工程で化合物 **23** の水酸基とアミノ基の両方と

化合物 **9** との縮合反応によって不純物 **72** が生成し、第 5, 6 工程でそれぞれ脱 Boc 化と化合物 **12** との縮合反応により不純物 **73** が生成し、最後に TFA 処理により副生するものと推察された(Fig. 3-25)。

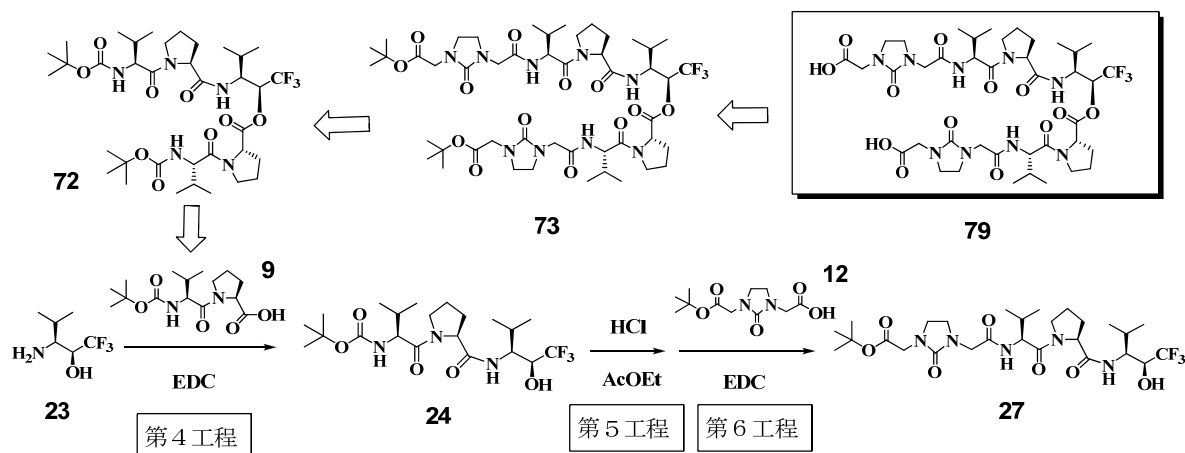


Fig. 3-25 不純物**79**の生成機構

そこで、まず不純物 **72** の結晶化による除去を検討した(Table 3-17)。

Table 3-17 不純物**72**の除去検討

#	DMF	H ₂ O	収率 (%)	72 (%)
1	—	—	—	2.46
2	3mL	3mL	93	2.48
3	3mL	1mL	90	1.08
4	6mL	2mL	86	1.21
5	6mL	1mL	69	0.50

その結果、*N, N*-ジメチルホルムアミド-水で再結晶を行えば不純物のある程度の除去は可能であった。また、同様にトリチュレーションの検討も行った。水およびイソプロピルエーテルでトリチュレーションを行うことにより、不純物 **72** を 2.5%から 0.94%まで減少させることができた。

次に、不純物 **72** のエステル構造部分を加水分解することにより化合物 **23** へと誘導できることから、6M NaOH 水溶液中、80°C で 4 時間攪拌処理した結果、収率 94%で不純物 **72** が 2.5%から 1.6%まで減少した。

また、化合物 **9** の当量の調整により不純物 **72** の生成量を抑制する方法を検討した。化合物 **23** に対して化合物 **9** をその 0.9eq.使用して*N, N*-ジメチルホルムアミド中HOBt, Et₃Nで反応を行った。その結果、収率 77%で不純物 **72** が 0.1%の化合物 **23** が得られることがわかった。

以上の検討結果より、化合物 **23** に対して化合物 **9** をその 0.9 eq.使用して*N, N*-

ジメチルホルムアミド中HOBt, Et₃Nで反応を行い、後処理後得られた結晶を水およびイソプロピルエーテルでトリチュレーションを行うことによって、化合物 **24** 中の不純物 **72** の含量を低下させることができ、その結果として不純物 **79** の生成は抑制できると考えられた。

以上得られた検討結果に基づいて、改良パイロット合成を行った(Fig. 3-26)。その結果、AE-3763 の総収率が 28.5%に向上し純度も 99.2%と飛躍的に向上した。又、不純物 **77**, **80** は ND となり、不純物 **74** は 0.195%から 0.034%に、不純物 **75** は 0.342%から 0.257%に、不純物 **76** は 0.305%から 0.055%に低減することができた(Fig. 3-27, 28)。

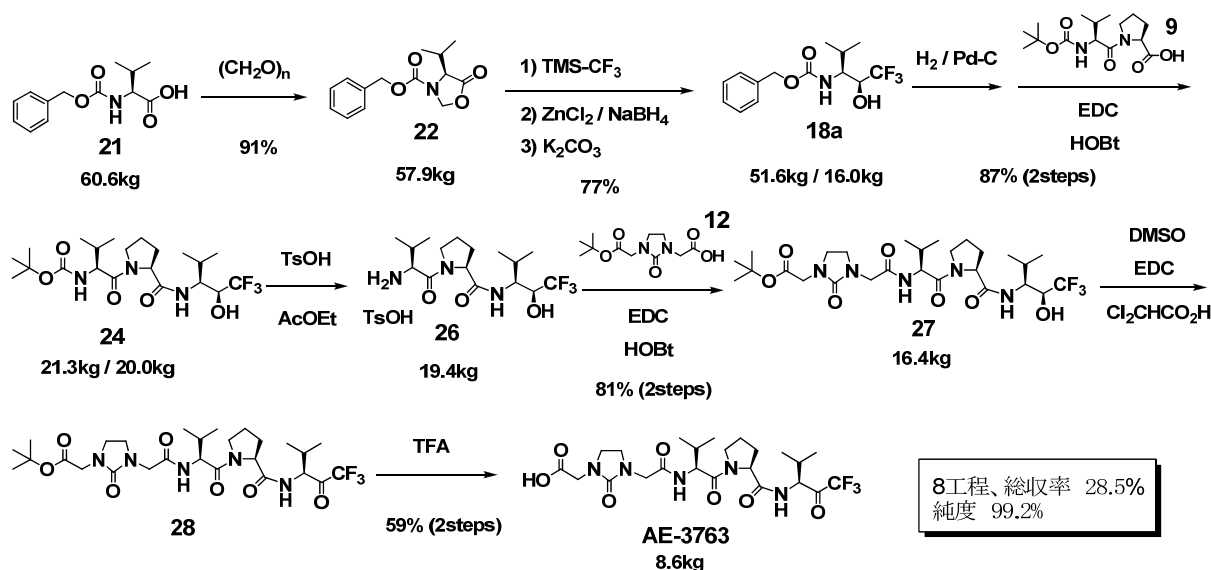


Fig. 3-26 改良パイロット合成法

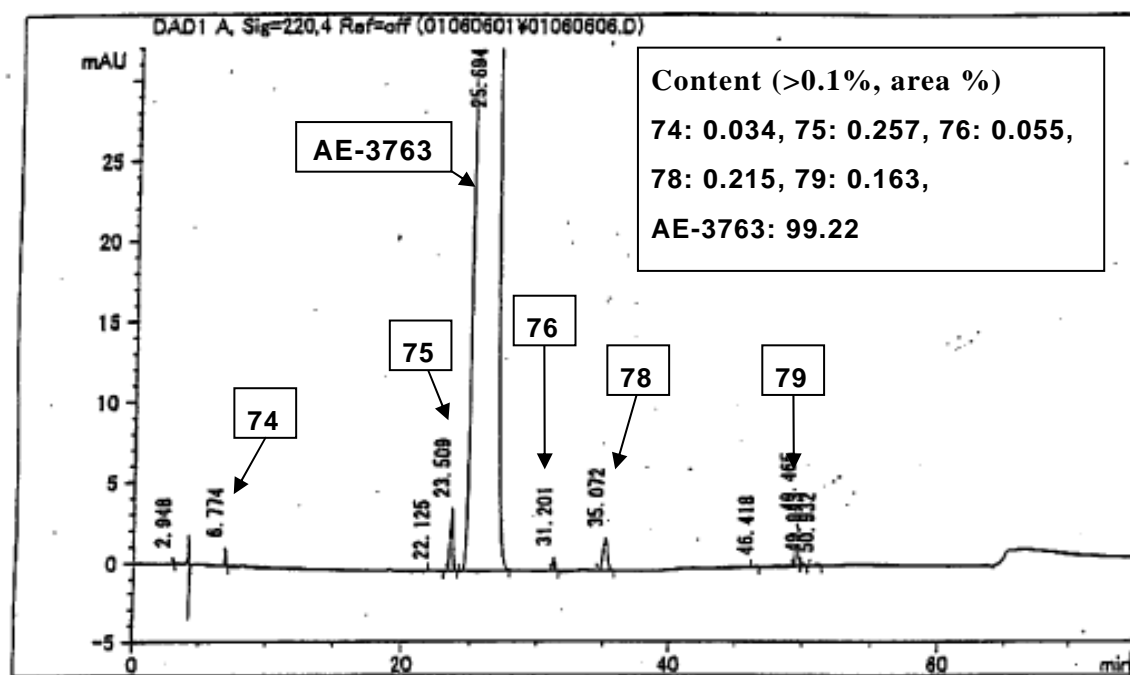


Fig. 3-27 AE-3763の改良パイロット合成品のHPLCチャート

[測定条件]

- ・ 試料溶液：本品をpH3.9リン酸・リン酸緩衝液（リン酸二水素カリウム6.8 gをHPLC用蒸留水950 mlに溶解し、リン酸でpH3.9に調整した後、水を加えて1000mlとする。）に溶解し、約2 mg/mlになるように調整する。
- ・ 検出器：紫外吸光光度計（220 nm）
- ・ カラム：J'sphere ODS-L80 (4.6 mm×250 mm, YMC社製)
- ・ カラム温度：40℃
- ・ 注入量：20 μ l
- ・ 移動相：

A：pH3.9リン酸・リン酸緩衝液/ アセトニトリル混液 (9:1)

B：pH3.9リン酸・リン酸緩衝液/ アセトニトリル混液 (4:6)

グラジエント条件

分析時間（分）	A (%)	B (%)
0	94	6
50	60	40
85	60	40
86	94	6
100	94	6

- ・ 流量：1.0 ml/min

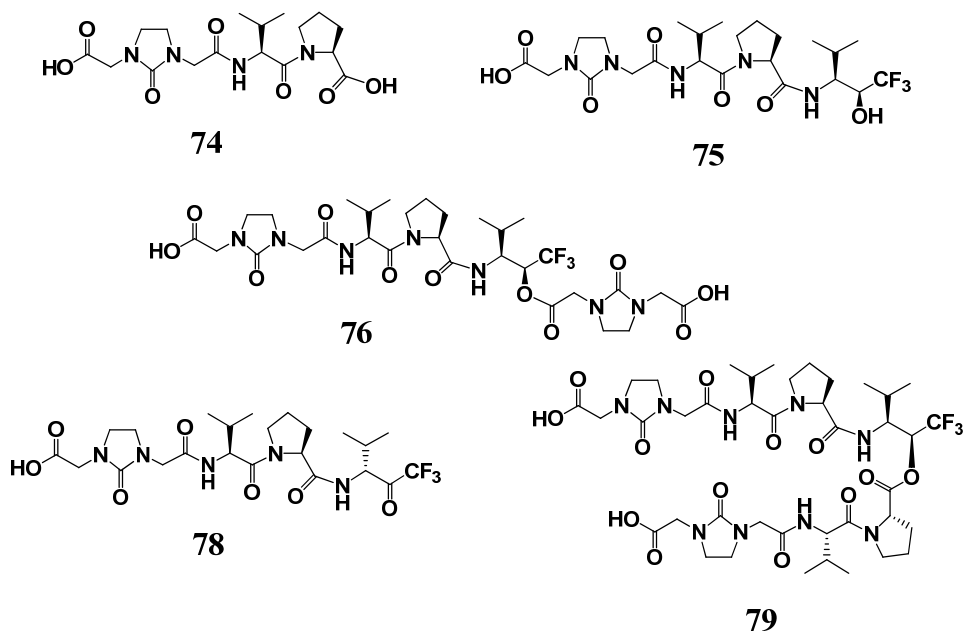


Fig. 3-28 AE-3763中の不純物74-79の構造式

3-6. 考察ならびに小括

ヒト好中球エラスターゼ (HNE)が関与する組織障害の治療薬、とりわけ急性期に使用可能な注射剤の開発を目的として探索研究を行った結果、薬効、物性および安全性の面で最も優れた化合物である**AE-3763**を見出し、これを開発化合物として選択した。そこで工業的に実施可能な**AE-3763**の製法の検討を行った。

ラボスケールで実施していた**AE-3763**の合成法の大きな課題として、以下の2点が挙げられた。

1) 出発物質の化合物**8**がラセミ体のため途中の中間体がすべてジアステレオマー混合物のため結晶化せず、各工程でカラム精製が必須となり、特に工程の最終段階では (*S,S,R*)-isomerとの分離が必要であった。

2) 最終工程で酸化剤として用いているDess-Martin試薬 (DMP)は反応系に加えるだけで反応が進行し、カルボニル α -位のラセミ化も進行しないことからラボ合成では優れた合成法であるが、DMPおよびその中間体が激しい爆発性を有しており、パイロット合成では使用できないことから、より緩和な酸化法の検討が必要であった。

以上の課題を解決することによって、**AE-3763**の工業的合成法の開発に目途をつけることができることからそれらの検討に着手し、 ZnCl_2 と NaBH_4 を用いた高収率・高立体選択的な(*2S,3S*)-**18a**の合成法を見出し、更にDMSO/EDC/ジクロロ酢酸を用いた温和で簡便な酸化法を見出した。

ラボ合成法の大きな課題であった1)立体選択的なトリフルオロメチルアルコールの合成、2)安全で簡便な酸化法、が解決したことから、パイロットスケールでの**AE-3763**の合成を行った。その結果、全8工程、収率12%とラボスケールでの収率2.3%より改善したものの、純度が97.8%と低下し、満足するものではなかった。

そこで、各工程において副生する不純物を同定し、その生成機構を推察することによって不純物の生成工程と原因を特定することができれば、**AE-3763**の純度と収率の向上が期待できることから、検討を行った。最後に各工程の最適化を行って、全8工程、総収率28.5%で純度99.2%の**AE-3763**の工業的合成法を確立することができた。

3-7. 実験の部

3-7-1. **AE-3763**の工業的合成法

Benzyl (4S)-5-oxo-4-(propan-2-yl) -1,3-oxazolidine-3-carboxylate (22)

Cbz-Val (60.6 kg)のトルエン (112.7 L)溶液にパラホルムアルデヒド (13.0 kg)を一度に加えた後、*p*-トルエンスルホン酸 (0.87 kg)を一度に加え、75~85°Cにて5時間加熱した。反応液を内温25~35°Cに冷却し、炭酸水素ナトリウム (11.5 kg) と水 (115.4 L)で調整した水溶液を加え、分相した。有機層を再び炭酸水素ナトリウム (11.5 kg)と水 (115.4 L)で調整した水溶液を加えて洗浄し、次に水 (126.9 L)で洗浄

後、内温50°C以下でオイル状になるまで減圧濃縮した。処理後、20～30°Cに冷却し、テトラヒドロフラン (176 L)に溶解させた。溶液の一部をとって含量を測定し、次工程の仕込み量を計算した。得られた化合物**22**のテトラヒドロフラン溶液は次工程へ送った。換算収量57.88 kg、換算収率91.2%。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.01 (3H, d), 1.08 (3H, d), 2.35 (1H, m), 4.23 (1H, br s), 5.15-5.60 (4H, m), 7.32-7.41 (5H, m); MS (LSI, positive) m/z 264 [(M+H)⁺].

Benzyl [(2S,3S)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]carbamate (18a)

化合物**22** (57.9 kg)を含むテトラヒドロフラン溶液に、CsF (6.8 kg)を一度に加え、次にTMSCF₃ (37.4 kg)を0～10°Cで30分かけて滴下した。同温で30分攪拌し、反応の終了を確認後、0～10°Cでメタノール (57.9 L) を加え、同温で30分攪拌した。反応液を50°C以下でオイル状になるまで減圧濃縮後、濃縮残渣に水 (173 L) を加え酢酸エチル (289 L)で抽出した。水層に酢酸エチル (145 L)を加え再び抽出し、合わせた有機層をNaCl (45.1 kg) と水 (127 L)で調整した溶液で洗浄し、MgSO₄ (29.0 kg)で乾燥後、オイル状になるまで50°C以下で減圧濃縮した。

次に、あらかじめ濃縮残渣に*t*-ブチルメチルエーテル (116 L)を加えて溶解させておき、別の容器に*t*-ブチルメチルエーテル (232 L)を入れ、窒素気流下、ZnCl₂ (22.4 kg)を添加した。次にNaBH₄ (12.5 kg)を加えて10分攪拌した。この懸濁液中にあらかじめ調整した濃縮残渣の*t*-ブチルメチルエーテル溶液を20～35°Cで滴下し、同温で13時間攪拌した。反応の終了を確認後、反応液を10～20°Cに冷却し、30°C以下に保ちながら、クエン酸一水和物 (86.8 kg)を水 (261 L)で調整した溶液を滴下した。15分以上攪拌後、静置し、分相して有機層を分取した。水層に酢酸エチル (289 L)を加えて抽出し、有機層を合わせた。次いで有機層をNaCl (45.1 kg) と水(128 L)で調整した水溶液で洗浄し、内温50°C以下でオイル状になるまで減圧濃縮した。

濃縮残渣にメタノール (173 L)と水 (173 L)を加えて溶解させ、20～30°Cに冷却後、K₂CO₃ (30.1 kg)を添加した。添加後同温で1時間攪拌し、反応の終了を確認後、反応液を内温50°C以下で約半量まで減圧濃縮し (メタノールを留去)、酢酸エチル (289 L)を加えて抽出し、酢酸エチル層を分取した。水層に酢酸エチル (289 L)を加えて再び抽出し、先程分取した酢酸エチル層と合わせ、NaCl (45.1 kg)と水 (128 L)で調整した水溶液で洗浄し、MgSO₄を加えて乾燥して、内温50°C以下で減圧濃縮した。濃縮残渣に*t*-ブチルメチルエーテル (58.2 L)を加え、内温50°C以下で結晶が析出するまで減圧濃縮し、濃縮残渣にイソプロピルエーテル (58.2 L)を加えて40～60°Cで加熱溶解し、40°C以下に冷却後、ヘプタン (174 L)を加えて結晶を晶出させた。10°C以下で1時間以上攪拌後、結晶を遠心分離し、0～5°Cに冷却したヘプタン (42.6 L)で洗浄した。得られた湿晶を50°C以下で恒量を確認するまで送風乾燥し、目的とする化合物**18a** (51.6 kg, 76.9%)を白色結晶として得た。

Mp 103-104 °C; [α]_D²⁴ -20.3° (c=1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 0.97 (3H, d), 1.03 (3H, d), 2.01 (1H, m), 3.70 (1H, d), 3.85 (1H, d), 4.13 (1H, m), 4.82 (1H, d), 5.11

(1H, d), 5.16 (1H, d), 7.26-7.39 (5H, m); HRMS (ESI, positive) m/z calcd for $C_{14}H_{19}O_3NF_3 [(M+H)^+]$ 306.1312, found 306.1308.

(2S,3S)-3-Amino-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-2-ol (23)

化合物**18a** (16.0 kg)を*N, N*-ジメチルホルムアミド (33.6 L)に溶解させ、反応機内を窒素置換後、50% Wet. 5% Pd/C (0.8 kg)を添加した。次に反応機内を水素置換し、内温30~40°Cで0.1~0.2Mpaにて3時間還元反応を行い、50% Wet. 5% Pd/C (0.3 kg)を更に追加して計7時間反応を行った。反応の終了を確認後、窒素加圧ろ過で触媒を除去し、更に*N, N*-ジメチルホルムアミド (6.5 L)で洗い込んで、得られた化合物**23**の*N, N*-ジメチルホルムアミド溶液はそのまま次工程へ送った。

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-valyl-*N*-[(2S,3S)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-*L*-prolinamide (24)**

化合物**23**の*N, N*-ジメチルホルムアミド溶液に*N, N*-ジメチルホルムアミド (25.5 L)を追加し、10°C以下に冷却して、Boc-Val-Pro-OH (**9**) (14.8 kg), HOBt (3.5 kg), Et₃N (6.4 kg)を順次添加した。最後にEDC (12.06 kg)を内温10°C以下で1時間かけて加え、同温で1時間攪拌後、成り行き温度にて終夜攪拌した。反応の終了を確認後、10°C以下に冷却し、炭酸水素ナトリウム (3.8 kg) と水 (72 L)で調整した水溶液を加えた。同温で1時間熟成攪拌し、析出した結晶を濾取し、水 (19 L)で洗浄した。得られた湿晶に水 (76.8 L)を加え、10~30°Cで30分スラリー攪拌した。スラリー液をろ過して得られた結晶を、水 (19 L)で洗浄し、イソプロピルエーテル(76.8 L)を加え10~30°Cで30分スラリー攪拌した。スラリー液を濾取し、イソプロピルエーテル (19 L)で洗浄して得られた湿晶を50°C以下で恒量を確認するまで送風乾燥し、目的とする化合物**24** (21.3 kg, 86.8%, 2 steps)を白色結晶として得た。含量は93%であった。

Mp 195-200 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.76-0.88 (12H, m), 1.35 (9H, s), 1.67 (1H, m), 1.77-1.99 (4H, m), 2.11 (1H, m), 3.51 (1H, m), 3.67-3.80 (2H, m), 3.96-4.02 (2H, m), 4.30 (1H, dd), 6.37 (1H, d), 6.71 (1H, d), 7.69 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 468 [(M+H)⁺].

***L*-Valyl-*N*-[(2S,3S)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-*L*-prolinamide 4-methylbenzenesulfonate (26)**

反応機に酢酸エチル (200 L)を仕込み、*p*-トルエンスルホン酸(18.9 kg)を加え、55~65°Cで加熱溶解した。同温で、化合物**24** (20.0 kg)を加え、1.5時間攪拌した。反応終了を確認後25~30°Cまで冷却し、イソプロピルエーテル (200 L)を滴下して10~30°Cで2時間攪拌した。晶出した結晶を濾取後、酢酸エチル (20.0 L)とイソプロピルエーテル (20.0 L)の混合溶媒でスラリー攪拌し、得られた湿晶を50°C以下で恒量を確認するまで送風乾燥し、目的とする化合物**26** (19.4 kg, 90.2%)を白色結晶として得た。

Mp 133-135 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.79 (3H, d), 0.81 (3H, d), 0.92 (3H, d), 0.98 (3H, d), 1.35 (9H, s), 1.67 (1H, m), 1.77 (1H, m), 1.93-2.15 (4H, m), 2.28 (3H, s), 3.44 (1H, m), 3.69-3.80 (2H, m), 3.97-4.04 (2H, m), 4.36 (1H, dd), 6.42 (2H, d), 7.10 (2H, d), 7.46 (1H, d), 7.82 (1H, d), 7.98 (2H, br s); MS (LSI, positive) *m/z* 368 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide (27)**

化合物**26** (19.4 kg)をピリジン (81 L)に溶解後、化合物**12** (7.6 kg)を加えた後、内温5°C以下に冷却し、HOBt (2.9 kg), EDC (7.6 kg)を順次加えた。10~30°Cで終夜攪拌し、反応の終了を確認後、反応液を内温50°C以下でオイル状になるまで減圧濃縮し、20~30°Cで、NaCl (42.7 kg) と水 (124 L)で調整した水溶液と、酢酸エチル (165 L)を加えて酢酸エチル抽出し、有機層を、クエン酸一水和物 (16.5 kg)と水 (147 L)で調整した水溶液、炭酸水素ナトリウム (16.5 kg)と水 (147 L)で調整した水溶液、NaCl (42.7 kg)と水 (124 L)で調整した水溶液でそれぞれ洗浄し、MgSO₄ (8.1 kg)で乾燥し、内温50°C以下で減圧濃縮した。

次に反応機を20~30°Cに冷却し、濃縮残渣にトルエン (165 L)を加え、70~80°Cで加熱溶解後、10~30°Cで終夜攪拌して晶出した結晶を濾取し、得られた湿晶を50°C以下で恒量を確認するまで送風乾燥し、目的とする化合物**27** (16.4 kg, 90.1%)を白色結晶として得た。

Mp 105-106 °C; ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.77-0.89 (12H, m), 1.40 (9H, s), 1.66-2.11 (6H, m), 3.34 (4H, m), 3.53 (1H, m), 3.67-3.80 (6H, m), 3.99 (1H, ddd), 4.27-4.35 (2H, m), 6.37 (1H, d), 7.69 (1H, d), 8.07 (1H, d); MS (LSI, positive) *m/z* 608 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1,1,1-trifluoro-4-methyl-2-oxopentan-3-yl]-L-prolinamide (28)**

反応機に酢酸エチル (54 L)及びDMSO (27 L)を仕込み、化合物**27** (16.4 kg)を加え、完全に溶解してからEDC (15.5 kg)を加えて、5°C以下に冷却した。ジクロロ酢酸 (3.5 kg)を内温5°C以下で短時間に滴下し、同温で30分攪拌した。反応の終了を確認後、反応液にNaCl (21 kg)と水 (61 L)で調整した水溶液と、酢酸エチル (110 L)を加えて酢酸エチル抽出し、有機層を濃塩酸 (12.1 kg) と水 (126 L)で調整した水溶液、炭酸水素ナトリウム (13.8 kg)と水 (125 L)で調整した水溶液、及びNaCl (35 kg)と水 (103 L)で調整した水溶液で洗浄し、MgSO₄ (9.2 kg)で乾燥して、内温50°C以下でアメ状になるまで減圧濃縮した。得られた化合物**28**を含む濃縮残渣を次工程へ送った。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.78-0.91 (12H, m), 1.40 (9H, s), 1.73-2.25 (6H, m), 3.34-3.79 (10H, m), 4.02 (1H, dd), 4.33 (1H, dd), 4.45 (1H, dd), 6.76 (1H, s), 6.86 (1H, s), 7.41 (1H, d), 8.08 (1H, d); MS (LSI, positive) *m/z* 606 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1,1,1-trifluoro-4-methyl-2-oxopentan-3-yl]-L-prolinamide (AE-3763, 34t)**

窒素気流下、化合物**28**の濃縮残渣にトルエン (82 L)とTFA (30.8 L)を加え、10～30℃で終夜攪拌し、反応終了を確認後、内温50℃以下で溶液量が1/4になるまで減圧濃縮した。濃縮残渣にイソプロピルエーテル (146 L)を加え、10～30℃で終夜攪拌した。晶出した結晶を濾取、洗浄して得られた湿晶をアセトン (164 L)に40～50℃で加熱溶解し、内温50℃以下でアモルファス状になるまで減圧濃縮した。濃縮残渣にメチルエチルケトン (54 L)と酢酸エチル (54 L)の混合溶媒を加え、内温65～75℃で加熱溶解し、成り行き温度で冷却し、終夜攪拌した。晶出した結晶を濾取、洗浄し、得られた湿晶を外温40℃で恒量を確認するまで真空乾燥して**AE-3763** (再結晶1回目) (10.1 kg)を得た。

得られた**AE-3763**を再びアセトン (101 L)に45～55℃で加熱溶解し、窒素加圧ボールフィルターを通してろ過した。ろ液を内温50℃以下でアモルファス状になるまで減圧濃縮し、メチルエチルケトン (40 L)と酢酸エチル (40 L)の混合溶媒を加え内温65～75℃で加熱溶解し、成り行き温度で冷却して終夜攪拌した。晶出した結晶を濾取、洗浄し、得られた湿晶を外温40℃で恒量を確認するまで真空乾燥して、目的とする**AE-3763 (34t)** を(8.57 kg, 59%, 2steps) を白色結晶として得た。純度は99.2%、異性体の不純物**78 (34u)** は0.22%であった。尚、Cbz-Valからの通算収率は28.5%であった。

Mp: 177-178°C; $[\alpha]_D^{20}$ -63.0° (c=1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.85-1.02 (12H, m), 1.90-2.31 (6H, m), 3.51 (4H, m), 3.68 (1H, m), 3.81-4.13 (5H, m), 4.58 (2H, m), 4.92 (1H, dd), 7.45 (2H, m); HRMS (ESI, negative) m/z calcd for C₂₃H₃₃O₇N₅F₃ [(M-H)⁻]:548.2327, found 548.2329.

3-7-2. 化合物 **64a, **64b**の合成**

Benzyl [(3*S*)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]carbamate (18a**, **18b**)**

化合物 **15** (5.0 g)のエタノール (50 ml)溶液に 0℃でNaBH₄ (570 mg)を加え、同温で 30 分攪拌後、反応液に室温でK₂CO₃ (2.1 g)と水 (50 ml)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を液量が半分になるまで減圧濃縮後、酢酸エチルで 3 回抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=4:1)で精製して、**18a**と**18b**の混合物 (3.0 g, 66%)を白色粉末として得た。尚、HPLCより **18a:18b**の比は 3:1 であった。

MS (LSI, positive) m/z 306 [(M+H)⁺].

(4*S*)-4-(Propan-2-yl)-5-(trifluoromethyl)-1,3-oxazolidin-2-one (63**)**

18aと**18b**の混合物 (3.0 g)の酢酸エチル溶液 (70 ml)に室温で20% Pd(OH)₂-C (300 mg)を加え、水素気流下、同温で2時間攪拌した。触媒を濾別後、濾液を減圧

濃縮し、濃縮残渣 (1.9 g)を得た。濃縮残渣の一部 (506 mg)をトルエン (10 ml)に溶解し、室温でCDI (575 mg)を加えて、同温で終夜攪拌した。反応液を水中にかけ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄で乾燥後、減圧濃縮して、目的物**63** (470 mg, 81%)を無色油状物として得た。この化合物はこれ以上精製することなく、次の反応に進んだ。

MS (LSI, positive) m/z 197 [(M+H)⁺].

(4S,5S)-3-Benzyl-4-(propan-2-yl)-5-(trifluoromethyl)-1,3-oxazolidin-2-one (64a) and (4S,5R)-3-Benzyl-4-(propan-2-yl)-5-(trifluoromethyl)-1,3-oxazolidin-2-one (64b)

化合物**63** (420 mg)の*N, N*-ジメチルホルムアミド (10 ml)溶液に、室温でK₂CO₃ (674 mg)と BnBr (417 mg)を加え同温で3時間攪拌した。反応液を水中にかけ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、MgSO₄で乾燥後、減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=95:5)で精製し、イソプロピルエーテルで結晶化を行って目的物**64a** (490 mg, 72%)を白色結晶として、次に(ヘキサン:酢酸エチル=10:1)で溶出して目的物**64b** (160 mg, 23%)を無色油状物として得た。

64a: Mp 92-93 °C; [α]_D²⁴ -48.1° (c=1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.06 (3H, d), 1.10 (3H, d), 2.18 (1H, dq), 3.70 (1H, dd), 4.08 (1H, d), 4.65 (1H, dq), 5.09 (1H, d), 7.26-7.40 (5H, m); HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₁₄H₁₇O₂NF₃ [(M+H)⁺] 288.1206, found 288.1202.

64b: [α]_D²⁴ -15.0° (c=1.0, CHCl₃); ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.88 (3H, d), 0.89 (3H, d), 2.12 (1H, dq), 3.62 (1H, dd), 4.01 (1H, d), 4.40 (1H, dq), 4.93 (1H, d), 7.26-7.40 (5H, m); HRMS (ESI, positive) m/z calcd for C₁₄H₁₇O₂NF₃ [(M+H)⁺] 288.1206, found 288.1201.

3-7-3. 不純物 **74-80** の合成

3-7-3-1. 不純物 **74** の合成

Benzyl 2-[3-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetate

化合物**12** (30 g)の*N, N*-ジメチルホルムアミド溶液 (300 ml)に、室温でK₂CO₃ (32 g)およびBnCl (15.5 g)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を水中にかけ酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。トルエン-ヘキサン (1:3, 360 ml)より結晶化し、析出した結晶を濾取、乾燥して目的物 (36.0 g, 89%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 1.40 (9H, s), 3.38 (4H, s), 3.79 (2H, s), 3.99 (2H, s), 5.13 (2H, s), 7.31-7.37 (5H, m); MS (LSI, positive) m/z 349 [(M+H)⁺].

2-[3-(2-Benzoyloxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetic acid

上記化合物 (32 g)のトルエン溶液 (160 ml)に、室温でTFA (160 ml)を加え、同温で2時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣に室温でイソプロピルエーテル (500 ml)を加え、終夜攪拌した。析出した粗結晶を濾取し、アセトン-イソプロピルエーテル (1:2, 600 ml)で再結晶を行って、目的物 (22.5 g, 84%)を白色粉末として得た。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 3.39 (4H, s), 3.82 (2H, s), 3.99 (2H, s), 5.13 (2H, s), 7.30-7.40 (5H, m), 12.7 (1H, s); MS (LSI, positive) *m/z* 293 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-L-proline (74)**

上記化合物 (14.5 g)のピリジン溶液 (300 ml)に室温でVal-Pro-OBn·HCl (16.9 g), EDC (10.4 g)およびHOBt (7.6 g)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を水中にあけ酢酸エチルで抽出し、有機層を1 M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をエタノール-酢酸エチル (1:1, 200 ml)に溶解し、室温で20% Pd(OH)₂-C (2.0 g)を加え、水素気流下、室温で30分攪拌した。触媒を濾過後、濾液を減圧濃縮し、残渣に酢酸エチル (200 ml)を加え終夜攪拌した。析出した結晶を濾取し、乾燥して目的物**74** (16.0 g, 81%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.86 (3H, s), 0.92 (3H, s), 1.77-1.99 (4H, m), 2.14 (1H, m), 3.37-3.79 (10H, m), 4.23 (1H, dd), 4.31 (1H, d), 8.14 (1H, d), 12.5 (2H, br s); MS (LSI, positive) *m/z* 399 [(M+H)⁺].

3-7-3-2. 不純物 **75** の合成

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide (75)**

化合物**27** (1.6 g)のジクロロメタン溶液 (20 ml)に、室温でTFA (20 ml)を加え、同温で30分間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣に室温でイソプロピルエーテルを加え、終夜攪拌した。析出した粗結晶を濾取し、酢酸エチルで再結晶を行って、目的物**75** (1.0 g, 70%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.77-0.89 (12H, m), 1.65-2.13 (6H, m), 3.34 (4H, s), 3.53 (1H, m), 3.68-3.79 (6H, m), 3.99 (1H, ddd), 4.27-4.34 (2H, m), 6.38 (1H, d), 7.70 (1H, d), 8.09 (1H, d), 12.6 (1H, br s); MS (LSI, positive) *m/z* 552 [(M+H)⁺].

3-7-3-3. 不純物 **76** の合成

***N*-{[3-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-2-([3-(2-*tert*-butoxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl)oxy]-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide (81)**

化合物**27** (13.4 g)のピリジン溶液 (200 ml)に、室温で化合物**12** (6.27 g), EDC (5.50 g)およびDMAP (135 mg)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を水中にあけ酢酸エチルで抽出し、有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナト

リウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (クロロホルム:メタノール=50:1)で精製して、目的物**81** (13.8 g, 74%)をfoamとして得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.76 (3H, d), 0.81-0.84 (6H, m), 0.88 (3H, d), 1.48 (18H, s), 1.65-2.04 (6H, m), 3.34-3.80 (16H, m), 4.11 (2H, s), 4.21-4.35 (3H, m), 5.33 (1H, m), 8.01 (1H, d), 8.10 (1H, d); MS (LSI, positive) *m/z* 848 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-2-([3-(carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl)oxy]-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide (76)**

化合物**81** (3.5 g)のジクロロメタン溶液 (15 ml)に、室温でTFA (15 ml)を加え、同温で40分間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を逆相カラム (担体:CHP-20P, 分離液:アセトニトリル:水=0:100→30:70)で精製して、目的物**76** (2.2 g, 73%)をfoamとして得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.76 (3H, d), 0.81-0.84 (6H, m), 0.88 (3H, d), 1.65-2.04 (6H, m), 3.34-3.82 (16H, m), 4.08 (1H, d), 4.13 (1H, d), 4.21-4.34 (3H, m), 5.33 (1H, m), 8.01 (1H, d), 8.11 (1H, d), 12.7 (2H, br s); MS (LSI, positive) *m/z* 736 [(M+H)⁺].

3-7-3-4. 不純物 **77** の合成

***N*-Acetyl-L-valyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-2-(benzyloxy)-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide**

化合物**24** (10.0 g)の*N*, *N*-ジメチルホルムアミド溶液 (100 ml)に、室温でBnBr (5.1 ml)およびAg₂O (14.9 g)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液をセライト濾過し、濾液を水中にあけ酢酸エチルで抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=3:1)で精製し、ヘキサンで結晶化し中間体(11.4 g)を得た。

同様に反応を行って、得られた中間体(15.8 g)に室温で4 M塩化水素-酢酸エチル (100 ml)を加え、同温で20分攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣に室温でイソプロピルエーテルを加え、終夜攪拌した。析出した固体を濾取し、これをピリジン (150 ml)に溶解して、氷冷下でAc₂O (26 ml)を滴下し、同温で2.5時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を水中にあけ酢酸エチルで抽出し、有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル-イソプロピルエーテルより結晶化して、目的物 (13.5 g, 91%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.77-0.80 (6H, m), 0.83 (3H, d), 0.87 (3H, d), 1.82 (3H, s), 1.66-2.06 (6H, m), 3.53 (1H, m), 3.73 (1H, m), 3.97 (1H, m), 4.06 (1H, ddd),

4.28-4.32 (2H, m), 4.67 (1H, d), 4.79 (1H, d), 7.32-7.39 (5H, m), 7.75 (1H, d), 8.02 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 500 $[(M+H)^+]$.

***N*-Acetyl-L-valyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide**

上記化合物 (13.0 g)のエタノール-酢酸エチル (1:2, 280 ml)溶液に、室温で20% Pd(OH)₂-C (5.0 g)を加え、水素気流下、室温で2時間攪拌した。更に20% Pd(OH)₂-C (1.0 g)を追加し、水素気流下、室温で終夜攪拌した。反応液を濾過後、濾液を減圧濃縮し、目的物(10.3 g, 96%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.77-0.80 (6H, m), 0.83 (3H, d), 0.87 (3H, d), 1.82 (3H, s), 1.65-1.99 (5H, m), 2.11 (1H, m), 3.52 (1H, m), 3.69-3.79 (2H, m), 4.00 (1H, ddd), 4.25-4.32 (2H, m), 6.38 (1H, d), 7.68 (1H, d), 8.01 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 410 $[(M+H)^+]$.

***N*-acetyl-L-valyl-*N*-[(3*S*)-1,1,1-trifluoro-4-methyl-2-oxopentan-3-yl]-L-prolinamide (77)**

上記化合物 (1.2 g)のDMSO-ジクロロメタン (1:2, 9 ml)溶液に、室温でEDC (5.0 g)を加えた後、氷冷下でジクロロ酢酸 (0.24 ml)を滴下し、同温で5分間攪拌した。反応液を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して、減圧濃縮中に析出した結晶を濾取し、乾燥して目的物**77** (0.33 g, 28%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.79 (3H, d), 0.84 (3H, d), 0.88 (3H, d), 0.92 (3H, d), 1.82 (3H, s), 1.72-1.98 (5H, m), 2.23 (1H, m), 3.52 (1H, m), 3.71 (1H, m), 4.01 (1H, dd), 4.30 (1H, dd), 4.42 (1H, dd), 6.77 (1H, s), 6.87 (1H, s), 7.41 (1H, d), 8.03 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 408 $[(M+H)^+]$.

3-7-3-5. 不純物 **78 の合成**

Benzyl (4*R*)-5-oxo-4-(propan-2-yl) -1,3-oxazolidine-3-carboxylate

Cbz-D-Val (150 g)のトルエン (500 ml)溶液に室温でパラホルムアルデヒド (33.3 g)および*p*-トルエンスルホン酸 (3.8 g)を加え、Dean-Stark管で生成する水を除去しながら1時間加熱還流した。反応液を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮し、目的物 (158 g, quant.) を無色油状物として得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 1.02 (3H, d), 1.08 (3H, d), 2.35 (1H, m), 4.23 (1H, br s), 5.16-5.59 (4H, m), 7.34-7.41 (5H, m); MS (LSI, positive) m/z 264 $[(M+H)^+]$.

Benzyl [(2*R*,3*R*)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]carbamate

上記化合物 (158 g)のテトラヒドロフラン (500 ml)溶液に、室温でCsF (18.2 g)を加え、次に氷冷下でTMSCF₃ (103.2 g)を滴下し、同温で1時間攪拌した。反応液にメタノール (160 ml)を加え、室温で30分間攪拌後、減圧濃縮した。残渣に水を加え酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。

次に、あらかじめ濃縮残渣に*t*-ブチルメチルエーテル (320 ml)を加えて溶解させておき、別の容器に*t*-ブチルメチルエーテル (640 ml)を入れ、窒素気流下、ZnCl₂ (61.3 g)を添加した。次にNaBH₄ (34.0 g)を加えて10分攪拌した。この懸濁液中にあらかじめ調整した濃縮残渣の*t*-ブチルメチルエーテル溶液を室温で滴下し、同温で終夜攪拌した。反応液に氷冷下で、10%クエン酸溶液を滴下した。15分以上攪拌後、静置し、分相して有機層を分取した。水層を酢酸エチルで抽出し、有機層を合わせた。次いで有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。

濃縮残渣にメタノール (500 ml)と水 (500 ml)を加えて溶解させ、室温でK₂CO₃ (83.0 g)を加え、同温で1時間攪拌した。反応液を約半量まで減圧濃縮後 (メタノールを留去)、酢酸エチル抽出し、有機層を飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をヘキサン-イソプロピルエーテル (4:1)より結晶化して、目的物 (129.0 g, 70%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, δ) 0.93 (3H, d), 1.02 (3H, d), 2.01 (1H, m), 3.73 (1H, d), 3.85 (1H, d), 4.12 (1H, m), 4.82 (1H, d), 5.11 (1H, d), 5.15 (1H, d), 7.33-7.39 (5H, m); MS (LSI, positive) m/z 306 [(M+H)⁺].

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-*L*-valyl-*N*-[(2*R*,3*R*)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-*L*-prolinamide**

上記化合物 (100 g)の酢酸エチル (500 ml)溶液に、50% Wet. 10% Pd/C (5.0 g)を加え、水素気流下、2時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を減圧濃縮した。

濃縮残渣のピリジン (560 ml)溶液に、室温で化合物9 (92.8 g)およびEDC (69.2 g)を加え、室温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を水中にあけ酢酸エチルで抽出した。有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣にイソプロピルエーテルを加え、析出した結晶を濾取、乾燥して、目的物 (127 g, 92%)を白色粉末として得た。¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.73-0.77 (6H, m), 0.83 (3H, m), 0.90 (3H, m), 1.35 (9H, s), 1.75-2.13 (6H, m), 3.55-3.62 (2H, m), 3.84 (1H, m), 3.99-4.04 (2H, m), 4.34 (1H, dd), 6.35 (1H, d), 6.77 (1H, d), 7.39 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 468 [(M+H)⁺].

***N*-[3-(2-*tert*-Butoxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl]-*L*-valyl-*N*-[(2*R*,3*R*)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-*L*-prolinamide**

上記化合物 (18.0 g)に室温で4 M塩化水素-酢酸エチル (100 ml)を加え、同温で1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣にイソプロピルエーテルを加え、析出した粉末を濾取、乾燥し、中間体を得た。

中間体 (14.9 g)のピリジン (149 ml)溶液に、室温で化合物**12** (9.5 g)およびEDC (8.5 g)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (酢酸エチル:アセトニトリル=100:0→2:1)で精製して、目的物 (11.4 g, 49%)をfoamとして得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.74-0.77 (6H, m), 0.84 (3H, d), 0.91 (3H, d), 1.40 (9H, s), 1.75-2.13 (6H, m), 3.34 (4H, m), 3.57-3.87 (7H, m), 4.02 (1H, m), 4.32-4.40 (2H, m), 6.35 (1H, d), 7.42 (1H, d), 8.09 (1H, d); MS (LSI, positive) *m/z* 608 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(3*R*)-1,1,1-trifluoro-4-methyl-2-oxopentan-3-yl]-L-prolinamide (78)**

上記化合物 (3.3 g) のDMSO-酢酸エチル (1:2, 16.5 ml)溶液に、室温でEDC (8.5 g)を加えた後、氷冷下でジクロロ酢酸 (0.7 g)を滴下し、同温で1時間攪拌した。反応液を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。

濃縮残渣のトルエン (20 ml)溶液に、室温でTFA (10 ml)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を逆相カラム (担体: CHP-20P, 分離液: アセトニトリル:水=0:100→20:80)で精製して、目的物**78** (2.0 g, 67%)をfoamとして得た。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃, δ) 0.86-1.06 (12H, m), 1.88-2.40 (6H, m), 3.47-4.02 (10H, m), 4.57 (1H, dd), 4.68 (1H, dd), 4.88 (1H, dd), 7.33 (1H, d), 7.71 (1H, d); HRMS (ESI, negative) *m/z* calcd for C₂₃H₃₃O₇N₅F₃ [(M-H)⁻] 548.2332, found 548.2328.

3-7-3-6. 不純物 **79** の合成

(2*S*,3*S*)-3-[[*N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-L-valyl-L-prolyl]amino]-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-2-yl *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-L-valyl-L-prolinate (72)

化合物**24** (2.0 g)のピリジン (20 ml)溶液に、室温で化合物**9** (2.4 g), EDC (1.5 g)およびDMAP (64 mg)を加え、同温で4時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を水中にあげ酢酸エチルで抽出し、有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (ヘキサン:酢酸エチル=3:2)で精製して、目的物**72** (2.0 g, 61%)をfoamとして得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.74 (3H, d), 0.79-0.89 (15H, m), 1.35 (18H, s), 1.64-2.03 (10H, m), 2.25 (1H, m), 3.49-4.03 (6H, m), 4.23-4.29 (2H, m), 4.44 (1H, dd),

5.30 (1H, m), 6.74 (1H, d), 6.91 (1H, d), 7.96 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 764 [(M+H)⁺].

(2S,3S)-3-[[N-({3-[2-(Benzyloxy)-2-oxoethyl]-2-oxoimidazolidin-1-yl}acetyl)-L-valyl-L-prolyl]amino]-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-2-yl N-({3-[2-(benzyloxy)-2-oxoethyl]-2-oxoimidazolidin-1-yl}acetyl)-L-valyl-L-prolinate

化合物**72** (1.9 g)に室温で4 M塩化水素-酢酸エチル (50 ml)を加え、同温で3時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣にイソプロピルエーテルを加え、析出した粉末を濾取、乾燥し、中間体を得た。

中間体 (1.6 g)のピリジン (20 ml)溶液に、室温でEDC (1.2 g), HOBt (0.77 g)および2-[3-(2-Benzyloxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetic acid (1.8g, 3-7-3-1.で合成)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (酢酸エチル:アセトニトリル=2:1→2:3)で精製して、目的物 (1.5 g, 54%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.74 (3H, d), 0.80-0.91 (15H, m), 1.64-2.05 (10H, m), 2.25 (1H, m), 3.36 (8H, s), 3.51-3.82 (8H, m), 3.97 (4H, s), 4.25-4.36 (4H, m), 4.46 (1H, dd), 5.13 (4H, s), 5.31 (1H, m), 7.31-7.37 (10H, m), 7.98 (1H, d), 8.12 (1H, d), 8.25 (1H, d); MS (LSI, positive) m/z 1112 [(M+H)⁺].

(2S,3S)-3-[[N-({3-(Carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl}acetyl)-L-valyl-L-prolyl]amino]-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-2-yl-N-({3-(carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl}acetyl)-L-valyl-L-prolinate (79)

上記化合物 (1.2 g)のエタノール (10 ml)溶液に、50% Wet. 10% Pd/C (0.5 g)を加え、水素気流下、1時間攪拌した。反応液を濾過し、濾液を減圧濃縮した。残渣にイソプロピルエーテルを加え、析出した固体を濾取、乾燥して、目的物**79** (0.8 g, 80%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.74 (3H, d), 0.80-0.91 (15H, m), 1.64-2.03 (10H, m), 2.25 (1H, m), 3.34-3.79 (20H, m), 4.25-4.35 (4H, m), 4.46 (1H, dd), 5.31 (1H, m), 7.98 (1H, d), 8.10 (1H, d), 8.23 (1H, d), 12.7 (2H, br s); MS (LSI, positive) m/z 932 [(M+H)⁺].

3-7-3-7. 不純物 **80** の合成

N-({3-[2-(Benzyloxy)-2-oxoethyl]-2-oxoimidazolidin-1-yl}acetyl)-L-valyl-N-[(2S,3S)-1,1,1-trifluoro-2-hydroxy-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide

化合物**25** (38.8 g)のピリジン (500 ml)溶液に、室温でEDC (18.4 g), HOBt (14.7 g)および2-[3-(2-Benzyloxy-2-oxoethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetic acid (25.3 g,

3-7-3-1.で合成)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣にトルエンを加え、析出した結晶を濾取、乾燥して目的物 (41.0 g, 67%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.77-0.81 (6H, m), 0.84 (3H, d), 0.88 (3H, d), 1.68 (1H, m), 1.81 (1H, m), 1.89-2.00 (3H, m), 2.11 (1H, m), 3.36 (4H, s), 3.53 (1H, m), 3.67-3.81 (4H, m), 3.97 (2H, s), 4.00 (1H, ddd), 4.27-4.35 (2H, m), 5.13 (2H, s), 6.38 (1H, d), 7.32-7.37 (5H, m), 7.70 (1H, d), 8.11 (1H, d); MS (LSI, positive) *m/z* 642 [(M+H)⁺].

***N*-({3-[2-(benzyloxy)-2-oxoethyl]-2-oxoimidazolidin-1-yl}acetyl)-L-valyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-2-(acetyloxy)-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide**

上記化合物 (10.0 g)のピリジン (50 ml)溶液に、室温でAc₂O (50 ml)およびDMAP (190 mg)を加え、同温で終夜攪拌した。反応液を減圧濃縮後、残渣を水中にあげ、酢酸エチルで抽出した。有機層を10%クエン酸溶液、飽和炭酸水素ナトリウム溶液、飽和食塩水で洗浄後、MgSO₄乾燥して減圧濃縮した。残渣をシリカゲルカラム (酢酸エチル)で精製後、逆相カラム (担体:CHP-20P, 分離液:アセトニトリル:水=0:100→50:50)で精製して、目的物 (4.2 g, 39%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.77 (3H, d), 0.82-0.84 (6H, m), 0.88 (3H, d), 1.67 (1H, m), 1.80-2.06 (5H, m), 2.16 (3H, s), 3.36 (4H, s), 3.54 (1H, m), 3.69-3.77 (3H, m), 3.97 (2H, s), 4.22 (1H, ddd), 4.27-4.35 (2H, m), 5.13 (2H, s), 5.29 (1H, m), 7.32-7.37 (5H, m), 8.00 (1H, d), 8.12 (1H, d); MS (LSI, positive) *m/z* 684 [(M+H)⁺].

***N*-{[3-(carboxymethyl)-2-oxoimidazolidin-1-yl]acetyl}-L-valyl-*N*-[(2*S*,3*S*)-2-(acetyloxy)-1,1,1-trifluoro-4-methylpentan-3-yl]-L-prolinamide (80)**

上記化合物 (4.0 g)のエタノール-酢酸エチル (1:1, 100 ml)溶液に、室温で50% Wet. 10% Pd/C (0.2 g)を加え、水素気流下、室温で10分間攪拌した。反応液を濾過後、濾液を減圧濃縮し、残渣にイソプロピルエーテルを加え、析出した固体を濾取、乾燥して、目的物**80** (3.2 g, 92%)を白色粉末として得た。

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆, δ) 0.77 (3H, d), 0.82-0.84 (6H, m), 0.88 (3H, d), 1.67 (1H, m), 1.80-2.06 (5H, m), 2.16 (3H, s), 3.34 (4H, s), 3.54 (1H, m), 3.70-3.80 (5H, m), 4.23 (1H, ddd), 4.27-4.34 (2H, m), 5.29 (1H, m), 8.00 (1H, d), 8.11 (1H, d); MS (LSI, positive) *m/z* 594 [(M+H)⁺].

3-8. 引用文献

1. (a) Prakash, G. K. S.; Yudin, A.K. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 757-786; (b) *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1112-1124; (c) *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1906-1918; (d) Ogilvie, W.; Bailey,

- M.; Poupart, M.-A.; Abraham, A.; Bhavsar, A.; Bonneau, P.; Bordeleau, J.; Bousquet, Y.; Chabot, C.; Duceppe, J.-S.; Fazal, G.; Goulet, S.; Grand-Maitre, C.; Guse, I.; Halmos, T.; Lavallee, P.; Leach, M.; Malenfant, E.; O'Meara, J.; Plante, R.; Plouffe, C.; Poirior, M.; Soucy, F.; Yoakim, C.; Deziel, R. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4113.
2. (a) Astra-Zeneca: US8501522 (**1985**); (b) Peet, N. P.; Burkhart, J. P.; Angelastro, M. R.; Giroux, E. L.; Mehdi, S.; Bey, P.; Kolb, M.; Neises, B.; Schirlin, D. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 394-407; (c) *Tetrahedron Lett.* **1985**, 135-138; (d) *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 4114.
3. Veale, C. A.; Bernstein, P. R.; Bohnert, C. M.; Brown, F. J.; Briant, C.; Damewood, J., J. R.; Earley, R.; Feeney, S. W.; Edwards, P. D.; Gomes, B.; Hulsizer, J. M.; Kosmider, B. J.; Krell, R. D.; Moore, G.; Salcedo, T. W.; Shaw, A.; Silverstein, D. S.; Steelman, G. B.; Stein, M.; Strimpler, A.; Thomas, R. M.; Vacek, E. P.; Williams, J. C.; Wolanin, D. J.; Woolson, S. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3173.
4. Andres, J. M.; Pedrosa, R.; Perez-Encabo, A. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**, 1558.
5. *J. Med. Chem.* **1992**, *35*, 641.
6. Walter, M. W.; Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Schofield, C. J. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 5179.
7. Sham, H. L.; Rempel, C. A.; Stein, H.; Cohen, J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1990**, 904.
8. Dess, D. B.; Martin, J. C. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 4155.
9. (a) Linderman, R. J.; Graves, D. M. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 4259; (b) Linderman, R. J.; Graves, D. M. *J. Org. Chem.* **1989**, *54*, 661.
10. (a) 磯江幸彦; 香好勲; 勝村成雄; 桑島功; 佐藤俊夫; 清水真; 高橋孝志; 武田猛; 谷野圭持; 中村栄一; 堀口良昭; 山田晴夫; 吉田潤一. 実験化学講座 **23** 有機合成 V, 丸善, **1991**, 第 4 版; (b) Hirano, M.; Oose, M.; Morimoto, T. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 1046; (c) Sato, K.; Aoki, M.; Takagi, J.; Noyori, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12386. (d) Yan, B.; Sun, Q.; Wareing, J. R.; Jewell, C. F. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 8765. (e) Roberts, S. M.; Woolley, G. T.; Newton, R. F. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1981**, 1729; (f) Edwards P. D. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 4279.
11. Reddy, G. V.; Rao, G. V.; Iyengar, D. S. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1985.

第4章 結語

感染症や炎症性疾患時に好中球の顆粒から大量に放出されるHNEの病態への関与が示唆されている疾患として、急性肺障害(ALI), 急性呼吸窮迫症候群(ARDS), 突発性肺繊維症(IIP), 嚢胞性肺繊維症、慢性間質性肺炎, 慢性閉塞性肺疾患(COPD), 臓器移植における拒絶反応, ショック, 敗血症, 全身性エリテマトーデス, 播種性血管内凝固症(DIC), 虚血-再灌流時の組織障害などが知られている。従って、エラスターゼ阻害剤はこれらの疾患の治療剤あるいは予防剤として有用であることが期待されることから、本研究では急性肺障害を中心とする急性期の臓器疾患を対象として、注射可能な水溶性阻害剤の開発を目的として本研究に着手した。

現在世界で唯一上市されているSivelestatに代表される、HNEの阻害メカニズムがacyl-enzyme形成に起因するタイプの阻害剤は、その構造中に活性エステル構造を有することから加水分解を受けやすく、血中で不安定なためその強い*in vitro*阻害活性と比較し*in vivo*薬効が弱いものが多かった。この様なタイプの阻害剤はsuicide inhibitorと呼ばれており、一般的に化学的に不安定で、この不安定さが*in vivo*薬効を減弱させる大きな要因になっている。そこでsuicide inhibitorとは異なる、生体内での安定性が高い阻害剤の探索を目指して新しいドラッグデザインを行った。

本研究では、HNE阻害剤のターゲットとして、遷移状態安定化に起因する阻害様式に着目した。このタイプの阻害剤は化学的に安定であるため、強い*in vivo*薬効が期待できる。遷移状態を安定化させる構造として、ベンゾオキサゾールケトン類、ハロアルキルケトン類、及びジケトエステル類等が挙げられるが、まずベンゾオキサゾールケトンに注目し、化合物**4**をリード化合物として、N末端側の水溶性基の変換により*in vivo*薬効が強くなり、かつ水溶性の良好な化合物を見いだすことを目指して合成展開を進めた(Fig. 4-1)。

水溶性基として末端にカルボキシル基を持つ種々の化合物を合成したところ、化合物**4**のベンゼン環を鎖状構造にすると*in vitro*阻害活性の低下がみられた一方、水溶性基との結合部分をオキシ酢酸からグリシンアミドへと変換した化合物**5**に*in vivo*薬効の上昇が認められた。したがってこの水溶性基部分は環状構造及びアミド官能基両方の存在が活性の向上に好ましいことが推察された。そこで、環状構造とアミド官能基を併せ持つ環状アミド化合物**6**を合成したところ、化合物**4**, **5**と比較して*in vivo*薬効が向上するだけでなく、水溶性も向上することがわかった。又これら環状アミド構造をもつ化合物は単回投与(iv bolus)よりも持続投与(iv infusion)の方がより薬効が強くなることがわかった。

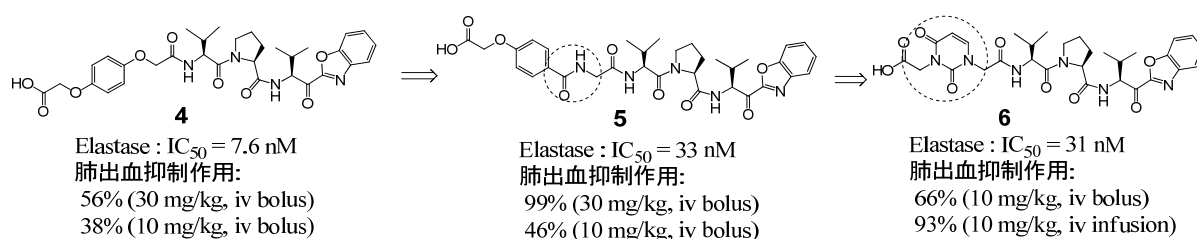


Fig. 4-1 水溶性基の最適化検討

次に、カルボニル活性基の検討を行った。プロテアーゼ阻害剤のカルボニル活性基として良く知られているCF₃基、ジケトエステル基、ジケトアミド基をカルボニル活性基として用い、水溶性基部分とカルボニル活性基の最適化を行った。その結果、各種*in vivo*試験で非常に優れた薬効を示し、優れた物性と中間体等の結晶化を含めた合成が容易な**AE-3763**を見出した(**Fig. 4-2**)。本化合物の水への溶解度はすべてのpHで>1000 mg/ml以上と非常に優れており、またHNE誘発肺障害での抑制作用を検討したところ、ED₅₀値は0.42 mg/kg/hr (iv infusion, 70 min) および1.2 mg/kg (iv bolus) であった。更に、LPS誘発肺障害モデルに対する最小有効量は1.5 mg/kg/hrで、LPS誘発肺浮腫に対する抑制作用も3 mg/kg/hrから効果がみられ、LPS/ガラクトサミン誘発多臓器障害マウスの生存率に対する改善効果でも有効性を示し、100 mg/kg, 6回投与群で20例中6例の死亡にとどまり、有意な生存率の改善が認められた。各疾患モデルにおいて、現在世界で唯一上市されているSivelestatよりも5~170倍強い薬効を示したことなどから、**AE-3763**は急性疾患治療を目的とする注射用剤に適した薬理特性および物性を有しており、HNEに起因するALI / ARDS等の疾患に対して既存のHNE阻害剤より高い治療効果が期待できるものと考えられる。

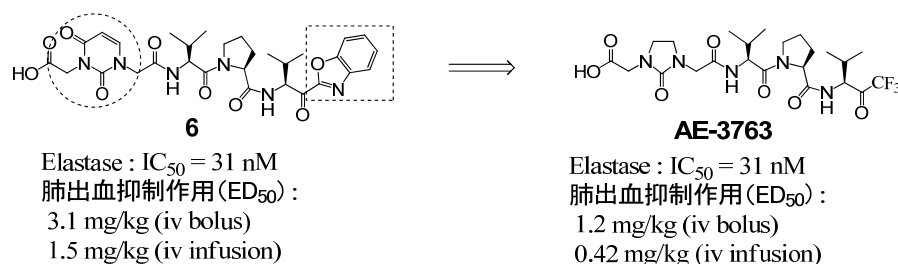


Fig. 4-2 水溶性基とカルボニル活性基の最適化による**AE-3763**の創製

以上の成果をもとに、工業的に実施可能な**AE-3763**の製法の検討を行った。ラボスケールで実施していた**AE-3763**合成法の大きな課題として、1)立体選択的なトリフルオロメチルアミノアルコールの合成、2)安全で簡便な酸化法の開発、の2点が挙げられた。これらの課題を解決することによって、**AE-3763**の工業的合成法の開発に目途をつけることができることからそれらの検討に着手し、ZnCl₂とNaBH₄を用いた高収率・高立体選択的なトリフルオロメチルアミノアルコールの合成法を見出し、更にDMSO/EDC/ジクロロ酢酸を用いた温和で簡便な酸化法を見出した。

ラボ合成法の大きな課題が解決したこと、パイロットスケールで合成を行った。その結果、全8工程、収率12%とラボスケールでの収率2.3%より改善したものの、純度が97.8%と低下し、満足するものではなかった。

そこで、**AE-3763**中の不純物を同定し、その生成機構を推察することによって純物の生成工程と原因を特定することができれば、**AE-3763**の純度と収率の向上が期待できることから、検討を行った。最後に各工程の最適化を行って、**AE-3763**の工業的合成法を確立することができた(**Fig. 4-3**)。

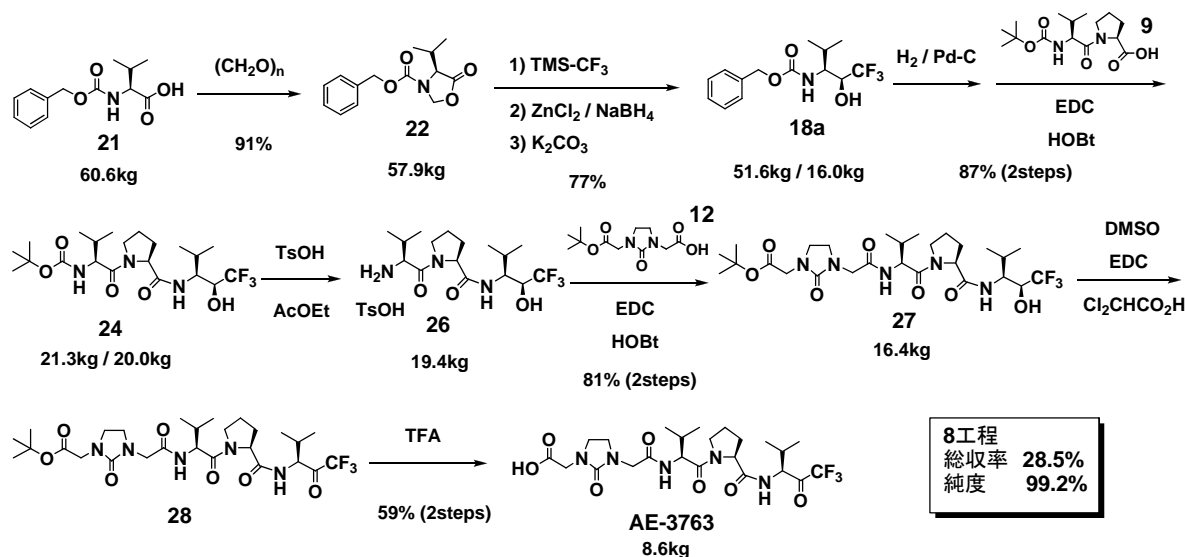
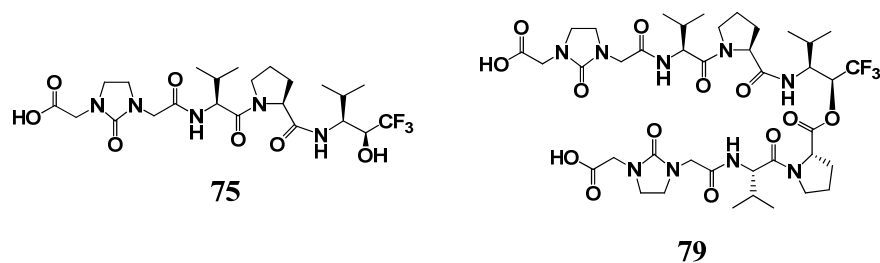


Fig. 4-3 AE-3763の工業的合成法

また更なる研究の展開には、依然0.1%を越える不純物**75**および**79**が存在することから、これら不純物の低減化に向けた検討を行う必要がある。更に不純物**75**はDMSO酸化の際のプメラータ転移に伴い生成する不純物であり、DMSO酸化を他の酸化法に変更することでその生成を抑制することが可能である。また比較的高額なEDCを使用する工程が3箇所もあることから、よりコストの安い試薬に変更できないか検討を行う必要がある。



謝辞

本論文をまとめるにあたり終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学講座 垣内喜代三教授に深く感謝し、心からお礼を申し上げます。

また、本論文を作成するにあたり、有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 廣田俊教授、伴正和教授、森本積准教授に心から感謝申し上げます。

本研究は、大日本製薬（現大日本住友製薬株式会社）において行われました。本研究の機会を与えてくださり、終始ご激励を賜りました、佐藤文憲博士、小宮雅信博士に心から感謝申し上げます。

本研究に関する論文投稿および本論文の作成の機会を与えてくださり、終始ご激励を賜りました、大野一教博士、藤田一司博士に心から感謝申し上げます。

本研究の推進、論文投稿にあたり、終始懇切なご指導とご助言を賜りました、川崎元士博士、藤原範雄博士に心から感謝申し上げます。

本研究の推進にあたり、化合物合成や製法について検討していただきました、面谷智喜博士、白武亮太郎氏に感謝申し上げます。

薬理学的評価を行っていただきました、武村忠氏、今野清美氏、岡崎洋博士、黒宮明美氏、久保多恵子氏をはじめとする薬理研究グループの方々に感謝申し上げます。

最後に、本論文を作成するにあたり、暖かく見守ってくれた、家族に心から感謝します。

研究業績リスト

学位論文の主たる部分を公表した論文

1. Design and synthesis of peptide-based carboxylic acid-containing transition-state inhibitors of human neutrophil elastase,
Fuminori Sato,* Yasunao Inoue, Tomoki Omodani, Kiyomi Imano, Hiroshi Okazaki, Tadashi Takemura and Masanobu Komiya,
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **2002**, *12*, 551-555.
2. Development of a highly water-soluble peptide-based human neutrophil elastase inhibitor; **AE-3763** for treatment of acute organ injury,
Yasunao Inoue,* Tomoki Omodani, Ryotaro Shiratake, Hiroshi Okazaki, Taeko Kubo, Akemi Kuromiya and Fuminori Sato,
Bioorganic & Medicinal Chemistry **2009**, *17*, 7477-7486.
3. Stereoselective synthesis of chiral β -amino trifluoromethyl alcohol: development of a manufacturing process for a key intermediate in the production of a novel elastase inhibitor, **AE-3763**,
Yasunao Inoue,* Tomoki Omodani, Ryotaro Shiratake and Fuminori Sato,
Tetrahedron: Asymmetry **2010**, *21*, 1855-1860.

参考論文

1. Saussureamines A, B, C, D, and E, new anti-ulcer principles from chinese Saussureae Radix,
Masayuki Yoshikawa,* Shoko Hatakeyama, Yasunao Inoue, and Johji Yamahara,
Chemical & Pharmaceutical Bulletin **1993**, *41*, 214-216.
2. A new approach to the synthesis of optically active *pseudo*-sugar and *pseudo*-nucleoside — Syntheses of *pseudo*- α -D-arabinofuranose, (+)-cyclaradine, and (+)-1-*pseudo*- β -D-arabinofuranosyluracil from D-arabinose —,
Masayuki Yoshikawa,* Nobutoshi Murakami, Yasunao Inoue, Shoko Hatakeyama, and Isao Kitagawa,
Chemical & Pharmaceutical Bulletin **1993**, *41*, 636-638.
3. Syntheses of *pseudo*- α -D-glucopyranose, *pseudo*- β -D-glucopyranose, and validamine from D-glucuronolactone,
Masayuki Yoshikawa,* Nobutoshi Murakami, Yasunao Inoue, Yasuyuki Kuroda, and Isao Kitagawa,
Chemical & Pharmaceutical Bulletin **1993**, *41*, 1197-1199.
4. Stereoselective conversion of D-glucuronolactone into *pseudo*-sugar: Syntheses of *pseudo*- α -D-glucopyranose, *pseudo*- β -D-glucopyranose, and validamine,

Masayuki Yoshikawa,* Nobutoshi Murakami, Yoshihiro Yokokawa, Yasunao Inoue,
Yasuyuki Kuroda and Isao Kitagawa,
Tetrahedron **1994**, 50, 9619-9628.

5. Facile syntheses of *pseudo*- α -D-arabinofuranosyl nucleosides, (+)-cyclaradine and (+)-1-*pseudo*- β -D-arabinofuranosyluracil, from D-arabinose,
Masayuki Yoshikawa,* Yoshihiro Yokokawa, Yasunao Inoue, Shoko Yamaguchi,
Nobutoshi Murakami and Isao Kitagawa,
Tetrahedron **1994**, 50, 9961-9974.
6. Absolute stereostructures and syntheses of saussureamines A, B, C, D and E, amino acid-sesquiterpene conjugates with gastroprotective effect, from the roots of *Saussurea lappa*,
Hisashi Matsuda, Tadashi Kageura, Yasunao Inoue, Toshio Morikawa and Masayuki Yoshikawa*,
Tetrahedron **2000**, 56, 7763-7777.

学会発表

1. 良姜 (*Alpiniae Officinarum Rhizoma*) acetone ext.抗潰瘍作用特性について、
井上泰尚、谷口久美子、北川知津子、山原條二、高石喜久、吉田雅昭、富松利明、
日本薬学会第 111 年会 (1991)。
2. 新規エラスターゼ阻害剤 **AE-3763** 及び関連化合物の合成と構造活性相関、
白武亮太郎、井上泰尚、面谷智喜、本多清二、佐藤文憲、
日本薬学会第 121 年会 (2001)。
3. Design and synthesis of water-soluble novel cyclic amide-containing transition-state inhibitors of human neutrophil elastase,
Yasunao Inoue, Tomoki Omodani, Ryotaro Shiratake, Seiji Honda, Fuminori Sato, Kiyomi Imano, Hiroshi Okazaki, Tadashi Takemura, Masanobu Komiya, Yoko kyoya and Masuo Kurono,
221st ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, April 1-5, 2001, Poster MEDI-242.
4. Novel peptidyl trifluoromethyl ketone inhibitor of human neutrophil elastase,
Tomoki Omodani, Yasunao Inoue, Ryotaro Shiratake, Seiji Honda, Fuminori Sato, Kiyomi Imano, Hiroshi Okazaki, Taeko Kubo, Akemi Kuromiya, Tadashi Takemura, Masanobu Komiya, Yoko Kyoya, Masuo Kurono and Junichi Tsuji,
221st ACS National Meeting, San Diego, CA, United States, April 1-5, 2001, Poster

MEDI-243.

5. Protease inhibitor 創製に有用な光学活性 trifluoromethyl amino alcohol の新規合成法、
面谷智喜、白武亮太郎、井上泰尚、佐藤文憲、
日本薬学会第 123 年会 (2003)。
6. 新規エラスターゼ阻害剤 **AE-3763** の製法検討、
井上泰尚、面谷智喜、白武亮太郎、岡野耕司、佐藤文憲、植田知彦、福田容三、林大至郎、
日本プロセス化学会 2003 サマーシンポジウム (2003)。
7. Design and synthesis of novel peptide-based orally active inhibitors of human neutrophil elastase,
Ryotaro Shiratake, Takashi Deguchi, Yasunao Inoue, Noriyuki Imayoshi, Tomohiko Ueda, Kenji Suzuki, Fuminori Sato, Akemi Kuromiya, Hiroshi Okazaki and Jun-ichi Tsuji,
230th ACS National Meeting, Washington, DC, United States, Aug. 28-Sept. 1, 2005, Poster MEDI-333.

特許

1. Preparation of proline-containing peptides, intermediates thereof, and elastase inhibitors,
Fuminori Sato, Yasunao Inoue, Tomoki Omodani, Ryotaro Shiratake, Seiji Honda, Masanobu Komiya, Tadashi Takemura,
WO2000052032 (2000).
2. Processes for producing (aminomethyl)trifluorocarinol derivatives,
Fuminori Sato, Tomoki Omodani, Ryotaro Shiratake, Yasunao Inoue, Takashi Deguchi,
WO2001044165 (2001).
3. Medicinal crystalline compounds,
Ryotaro Shiratake, Noriyuki Imayoshi, Yasunao Inoue, Fuminori Sato,
WO2006025216 (2006).