シクロプロペノン骨格を有する
新規システインプロテアーゼ阻害薬の創薬研究

榊　敏朗

2015/09

本学位論文は、下記の原著論文を基に作成され、東北大学大学院薬学研究科に提出されたものである。

1. Ando, R.; Sakaki, T.; Morinaka, Y.; Takahashi, C.; Tamao, Y.; Yoshii, N.; Katayama, S.; Saito, K.; Tokuyama, H.; Isaka, M.; Nakamura, E. Cyclopropenone-containing cysteine proteinase inhibitors. Synthesis and enzyme inhibitory activities. *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 571–579.
2. Ando, R.; Sakaki, T.; Jikihara, T. Convenient synthesis of 2-phenylcyclopropenone acetals. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 3617–3618.
3. Sakaki, T.; Ando, R. 2-*tert*-Butoxy-3-phenylcyclopropanone acetal, a stable precursor of lithiated 2-phenylcyclopropenone acetal. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7011–7014.

目次

第Ⅰ章　はじめに　1

1. 研究の背景
2. 研究の目的

第Ⅱ章　新規システインプロテアーゼ阻害薬の設計と一般的合成法および構造最適化　7

1. 序
2. ドラッグデザイン
3. 探索合成段階での合成方法
4. シクロプロペノン環の置換基選択
5. 1′位の絶対立体配置とペプチドユニットの最適化
6. アミノ置換基の変換
7. まとめ

第Ⅲ章　システインプロテアーゼ阻害薬開発候補化合物 BDA–410 の作用機序と生理活性　30

1. 序
2. BDA–410 のカルパインに対する酵素阻害様式および選択性の検討
3. （補足）BDA–410 の *in vivo* 薬理評価
4. まとめ

第Ⅳ章　開発候補化合物 BDA–410 の実用的合成法の開発　33

1. 序
2. 液体アンモニア溶媒を回避する合成法の開発
3. 熱的に安定な重要中間体の検討
4. 付加反応におけるジアステレオ選択性の検討
5. NH 基の系中でのメタル化
6. 塩化セリウムの調製方法
7. 立体異性体の分離、精製
8. 研究部門での改良合成法
9. （補足）PC 原薬の製造
10. まとめ

総括　53

実験の部　58

1. 第Ⅱ章に関する実験項
2. 第Ⅲ章に関する実験項
3. 第Ⅳ章に関する実験項

参考文献　89

謝辞　100

本論文中において、下記の略号を用いた

Ala	アラニン	alanine
APP	アミロイド前駆体蛋白質	amyloid precursor protein
aq.	水溶液	aqueous solution
BF	前脳基底部	basal forebrain
Boc	*tert*-ブトキシカルボニル基	*tert*-butoxycarbonyl group
BP	分解生成物	breakdown product
Cbz	ベンジルオキシカルボニル基	benzyloxycarbonyl group
CDK5	サイクリン依存性キナーゼ 5	cyclin-dependent kinase 5
Cys	システイン	cysteine
DBU	ジアザビシクロウンデセン	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DMF	ジメチルホルムアミド	*N*,*N*-dimethylformamide
DMI	1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン	1,3-dimethyl- 2-imidazolidinone
DMSO	ジメチルスルホキシド	dimethyl sulfoxide
DSC	示差走査熱量測定	differential scanning calorimeter
EDTA	エチレンジアミン四酢酸	ethylenediaminetetraacetic acid
eq.	当量	equivalent
Gln	グルタミン	glutamine
Gly	グリシン	glycine
HMPA	ヘキサメチルリン酸トリアミド	hexamethylphosphoric triamide
HPLC	高速液体クロマトグラフィ	high performance liquid chromatography
hr	時間	hour
IC_{50}	50%阻害濃度	half maximal inhibitory concentration
ip	腹腔内投与	intraperitoneal injection
KA	カイニン酸	kainic acid

LDA	リチウムジイソプロピルアミド	lithium diisopropylamide
Leu	ロイシン	leucine
liq.	液体	liquid
logP	オクタノール / 水分配係数	octanol – water partition coefficient
MAP2	微小管結合タンパク質 2	microtubule associated protein 2
MCA	4-メチルクマリル-7-アミド	4-methylcoumaryl-7-amide
n	ノルマル	normal
NMP	1-メチル-2-ピロリドン	1-methyl-2-pyrrolidinone
NMR	核磁気共鳴	nuclear magnetic resonance
PDB	蛋白質構造データバンク	Protein Data Bank
p.o.	経口投与	Per Os
quant.	定量的	quantitative
RAWM	放射状水迷路	radial arm water maze
rt	室温	room temperature
t, tert	三級	tertiary
t-BuOK	カリウム *tert*-ブトキシド	potassium *tert*-butoxide
THF	テトラヒドロフラン	tetrahydrofuran
TMEDA	テトラメチルエチレンジアミン	tetramethylethylenediamine
Trp	トリプトファン	tryptophan
Tyr	チロシン	tyrosine
veh	薬効を持たない賦形剤	vehicle
WT	野生型	wild type

第 I 章　はじめに

1.　研究の背景

蛋白質分解酵素の阻害は創薬ターゲットとして広く利用されており、表 1.1 に示す通り抗血栓薬、降圧薬、抗ウィルス薬など多くの医薬品が市販されている[1,2]。そして、標的となる蛋白質分解酵素群は、活性触媒基の種類によりセリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、金属プロテアーゼ、システインプロテアーゼ等に分類される[3]。

表 1.1 蛋白質分解酵素をターゲットとした主な医薬品

触媒機構による分類	標的酵素	医薬品（商品名）の事例	主な適応症
セリンプロテアーゼ	トロンビン	アルガトロバン（ノバスタン®） ダビガトラン（プラザキサ®）	脳血栓症
	トリプシン	カモスタット（フオイパン®） ナファモスタット（フサン®）	慢性膵炎
	NS3–4A プロテアーゼ	テラプレビル（テラビック®） シメプレビル（ソブリアード®）	C 型慢性肝炎
	ジペプチジルペプチターゼ	テネリグリプチン（テネリア®） シタグリプチン（ジャヌビア®）	２型糖尿病
	プラスミン	トラネキサム酸(トランサミン®)	出血
アスパラギン酸プロテアーゼ	HIV プロテアーゼ	アタザナビル（レイアタッツ®）	HIV–1 感染症
	レニン	アリスキレン（ラジレス®）	高血圧症
金属プロテアーゼ	アンジオテンシン変換酵素	イミダプリル（タナトリル®） エナラプリル（レニベース®）	高血圧症

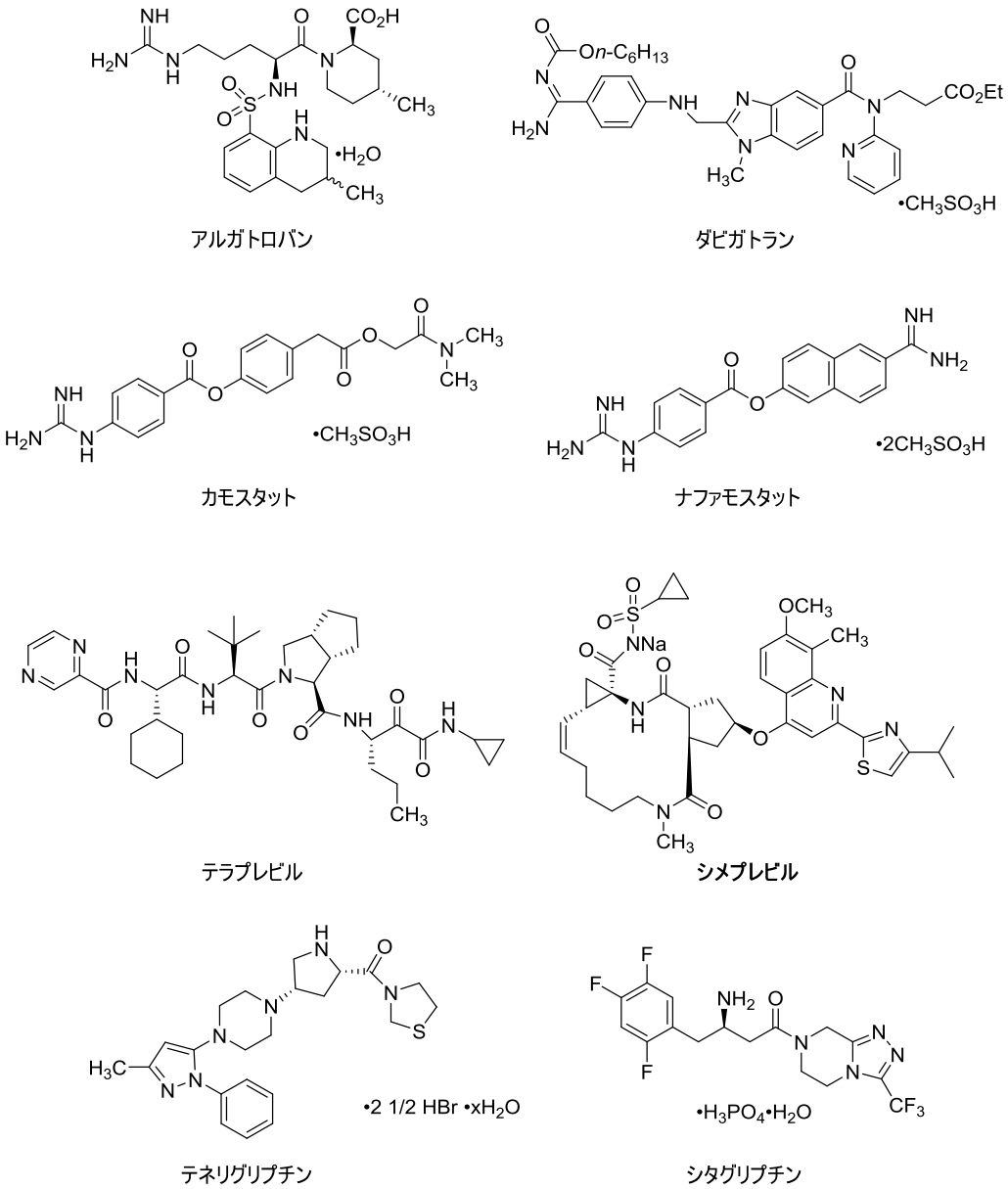


図 1.1 蛋白質分解酵素をターゲットとした主な医薬品の構造

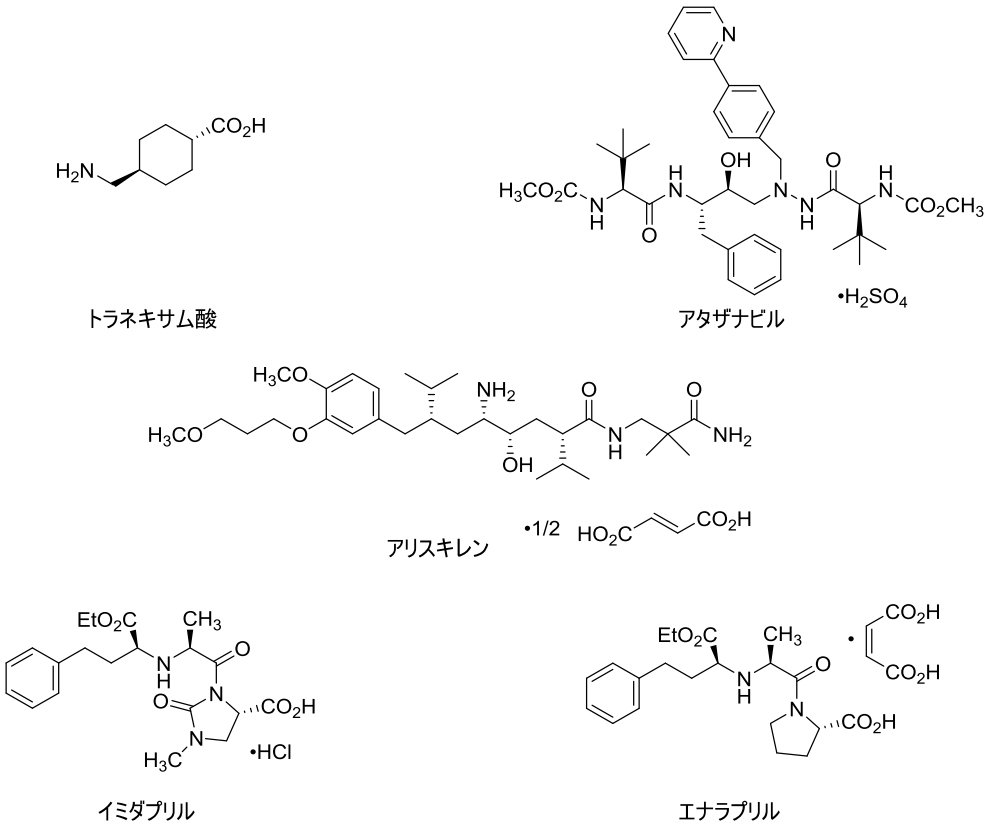


図 1.2 蛋白質分解酵素をターゲットとした主な医薬品の構造（続き）

蛋白質分解酵素のうち、システインプロテアーゼは他のプロテアーゼに比べ、これまで創薬ターゲットとして十分用いられていなかった。しかしながら、カテプシン B、カテプシン H、カテプシン L、カルパイン、インターロイキン 1β 変換酵素等システインプロテアーゼの生体内での働きが解明されるに従い、それらの亢進が種々の疾病の原因であることが判明してきた。さらに、システインプロテアーゼ阻害薬がこれらの疾患の動物モデルで有効であるという報告も増えつつあり、システインプロテアーゼは創薬ターゲットとして今後の利用が大いに期待されている[4]。

例えば、カテプシン B の阻害は炎症[5]および癌の転移[6]、 カテプシン H の阻害は炎症[5]、カテプシン L の阻害は骨粗鬆症[7]、カスパーゼ–1 (IL–1β 変換酵素) の阻害は細胞のアポトーシスに効果があると報告されている[8]。とりわけカルパインは[9–11]、細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇により活性化され、表 1.2 に示す通り神経変性疾患を始めとする多くの疾患、すなわち、ア

ルツハイマー型認知症、心筋梗塞や脳卒中等の虚血性疾患、頭部外傷、筋ジストロフィー・筋萎縮症、神経細胞の脱髄によって起こる疾患、白内障等へ関与していると考えられていることから、予防薬・治療薬の創薬ターゲットとして注目を集めている[4, 12–15]。

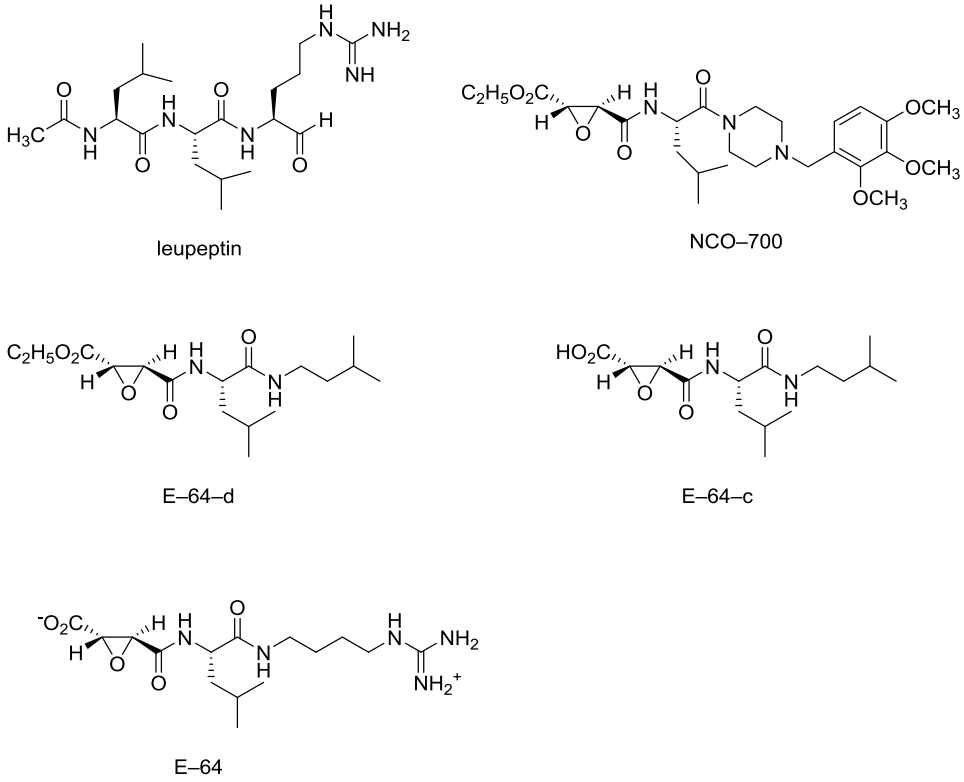


図 1.3 カルパイン阻害薬の構造

カルパインは、細胞質内に存在し Ca^{2+}濃度と内因性の阻害蛋白質カルパスタチンによりその機能が厳密に制御されており、受容体蛋白質、細胞骨格蛋白質、膜内在性蛋白質を特異的に分解しその機能調節を行うなど、高次で重要な役割を果たしている[31]。表 1.3 に示す通り、主に精製酵素を用いた *in vitro* の検討により細胞骨格蛋白質、膜受容体、シグナル伝達や代謝経路に関与する G-蛋白質・カルモジュリン結合蛋白質・酵素がカルパインの良い基質になっていることが報告されている[4]。生理的な作用として、カルシウムを介した情報伝達の初期過程[32]、細胞骨格の動的な再構築、有糸分裂や筋細胞の分化などの細胞分化との

かかわりがあると言われており、またグルタミン酸作動性シナプスの長期増強、サイトカインのプロセッシングや細胞膜融合等にも関与すると報告されている。

ハーバード大学（当時）の Nixon 博士と当研究所の斎藤博士らはカルパインの異常活性化とアルツハイマー型認知症との関係に着目し、アルツハイマー型認知症におけるカルパイン原因仮説を提唱した[33, 34]。すなわち、図 1.4 に示す通り、カルパインの異常活性化が直接神経細胞死を引き起こすほか、アミロイド前駆体蛋白質の異常代謝、および異常代謝によるアミロイド蓄積を引き起こし、神経細胞死に至らしめるという仮説である。近年、カルパインによる p25 蛋白質の過剰発現が CDK5 の異常活性化を引き起こし、アミロイド蓄積、神経原線維化、さらには神経細胞死につながると報告されている[35]。

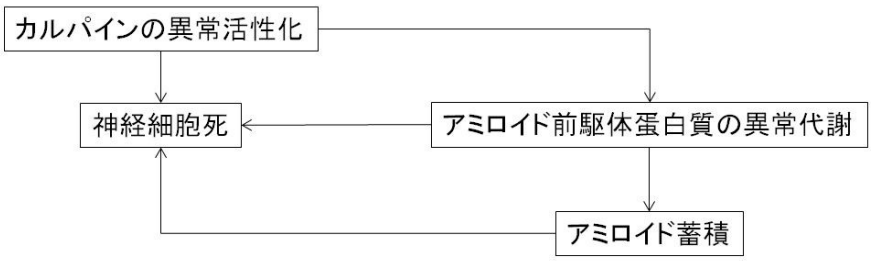


図 1.4 アルツハイマー型認知症のカルパイン仮説（Nixon 博士）

（脚注）近年、放医研の樋口、理研の西道らは、カルパインがアルツハイマー型認知症のアミロイド蓄積に伴う神経傷害を促進するのみならず、アミロイド蓄積自体も加速することを報告しており、カルパイン阻害薬がアルツハイマー型認知症の根本的な治療につながる薬剤になり得ることを示した（Higuchi, M. *et al*., Mechanistic involvement of the calpain-calpastatin system in Alzheimer neuropathology. *FASEB Journal* **2012**, 26, 1204–1217）。また、AbbVie 社はカルパイン阻害薬 ABT-957 の Phase 1 臨床試験を軽度～中等度のアルツハイマー型認知症患者で 2014 年 8 月より開始している（clinicaltrials.gov.）。

2.　研究の目的

既知のカルパイン阻害薬の多くが不可逆的阻害薬であり、標的酵素以外の生体構成成分と非特異的に反応するため安全性に問題があると言われており、臨床的に用いられた化合物も限られている。一方、可逆的阻害薬としてペプチジルアルデヒド等が知られているが、化学的な安定性、生体内での安定性、細胞膜の透過性など種々の問題があると報告されている[4, 13, 14]。

そこで著者は本創薬研究において、これまでに現東京大学の中村らが開発したシクロプロペノンアセタール誘導体 **1**[36–40] を用い、アルツハイマー型認知症の予防・治療を目指したシクロプロペノン環を有する新規システインプロテアーゼ阻害薬の設計と合成を行った。

さらに開発候補化合物として選抜された BDA–410 **2a** の高次薬理試験用検体および毒性試験用検体を供するための実用的合成法の開発を行った。

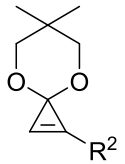


図 1.5 シクロプロペノンアセタール誘導体 **1**

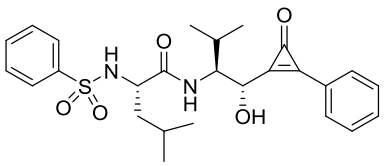


図 1.6 BDA–410 **2a**

第Ⅱ章　新規システインプロテアーゼ阻害薬の設計と一般的合成法および構造最適化

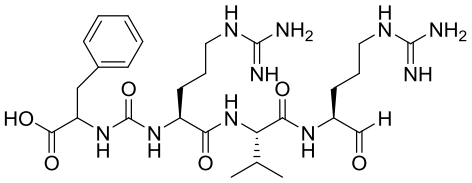
1.　序

既存のカルパイン阻害薬としては、不可逆的阻害薬であるエポキシコハク酸誘導体 E–64–d、α-置換ケトン、可逆的阻害薬であるペプチジルアルデヒド等がすでに報告されている（表 2.1）[4, 13, 14]。しかしながら、いずれの化合物も毒性、化学的な安定性、生体内での安定性等に課題があり実用化には至っていない。これらの中で大正製薬の E–64–d が 1984 年から筋ジストロフィーを適応に臨床試験を開始したが、承認申請後に開発は中止されている[41]。

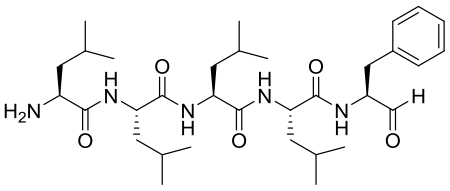
表 2.1 既知のシステインプロテアーゼ阻害薬

分類	化合物	構造	開発会社	備考	文献
蛋白質	calpastatin	蛋白質		内因性の阻害蛋白質。	42
可逆的ペプチド阻害薬	leupeptin	アルデヒド誘導体	日本化薬	天然物。他のシステインプロテアーゼやセリンプロテアーゼも阻害。	43, 44
	antipain				43, 45
	staccopins P1		サントリー	天然物。セリンプロテアーゼは阻害しない。ペンタペプチド誘導体。	46
	staccopins P2				
	calpain inhibitor I			膜を比較的透過しやすいが、カテプシン K (calpain inhibitor I), B (calpain inhibitor II)への阻害がより強い。	47
	calpain inhibitor II				
	calpeptin		サントリー	N 末を修飾した第二世代 : 膜透過性が向上したが、化学的、生体内で不安定。	44, 48
	MDL28170		HMR		44, 49, 50
	compound 32	α-ケトエステル誘導体	Cortex / Alkermes	もともとセリンプロテアーゼ阻害薬として知られていたが、カルパインに対し一定の選択性を示す。	51
	CX–269	α-ケトアミド誘導体			
	AK–275			水溶解度が悪い。	52
	AK–295			AK-275 の水溶解性を改善、梗塞領域を 32%減少。	53
	WIN–69211	ペプチド誘導体	Sanofi Winthrop	天然物。	54
	WIN–68100			天然物。	
不可逆的ペプチド阻害薬	E–64–d	エポキシコハク酸誘導体	大正製薬	天然物 E–64 の膜透過性を改善した誘導体。システインプロテアーゼに選択性が高いがカルパイン以外も阻害する。	55, 56
	NCO–700		日本ケミファ	心筋梗塞の動物モデルで効果を示す。	21, 22

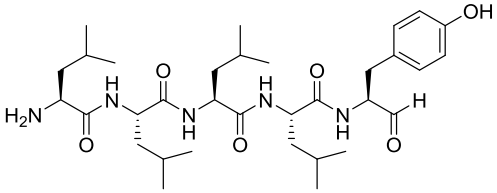
	compound 4f	α-フルオロケトン誘導体	セファロン	他のシステインプロテアーゼに対する選択性は達成できていない。	57
	MDL201053		HMR		58
	compound 3	ジスルフィド誘導体	第一三共	他のシステインプロテアーゼ（カテプシン B、パパイン)、セリン・アスパラギン酸プロテアーゼに選択性有り。	59
	compound 69	アシルオキシメチルケトン誘導体	Sanofi Winthrop	カテプシン B, L に対し選択性有り。	60
非ペプチド阻害薬	compound 8	キノリンカルボキサミド誘導体	Sanofi Winthrop	可逆的阻害。カテプシン B, L に対し選択性有り、カゼインに対し非拮的抗阻害。	61
	PD150606	α-メルカプトアクリル酸誘導体	Parke-Davis	可逆的阻害、カゼインに対し非拮抗阻害。K_i 0.21 μM でカルパイン選択的。Ca^{2+}結合サイトを阻害している可能性。	62
	PD151746			PD150606 の類縁体。	
	cystamidin A	酸アミド誘導体	北里研究所	天然物。	63



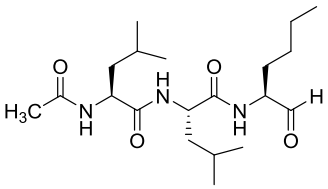
antipain



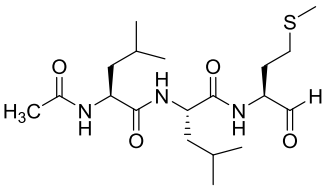
staccopins P1



staccopins P2



calpain inhibitor I



calpain inhibitor II

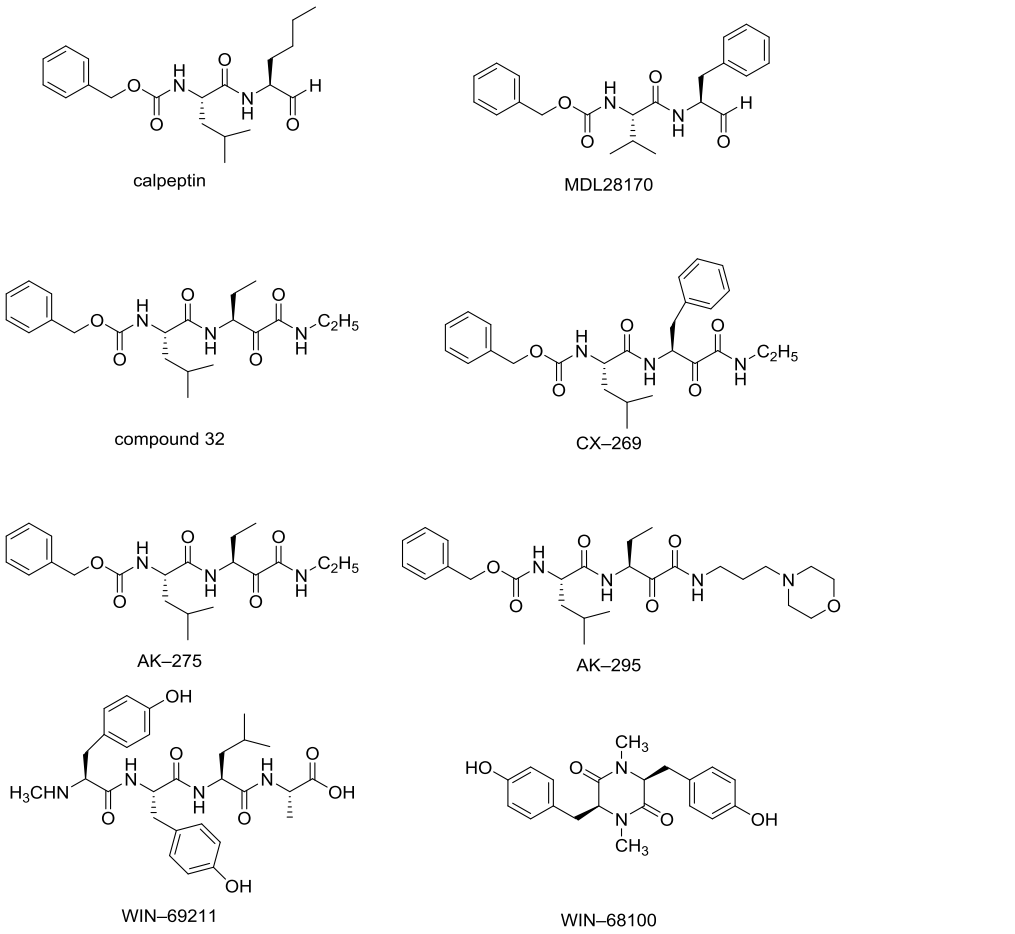


図 2.1 可逆的ペプチド阻害薬の化学構造

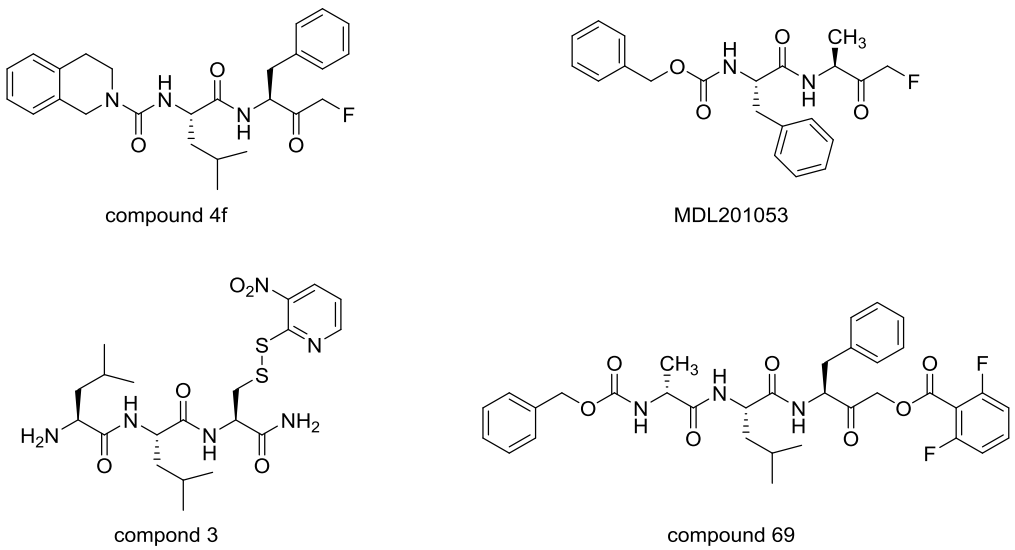


図 2.2 不可逆的ペプチド阻害薬の化学構造

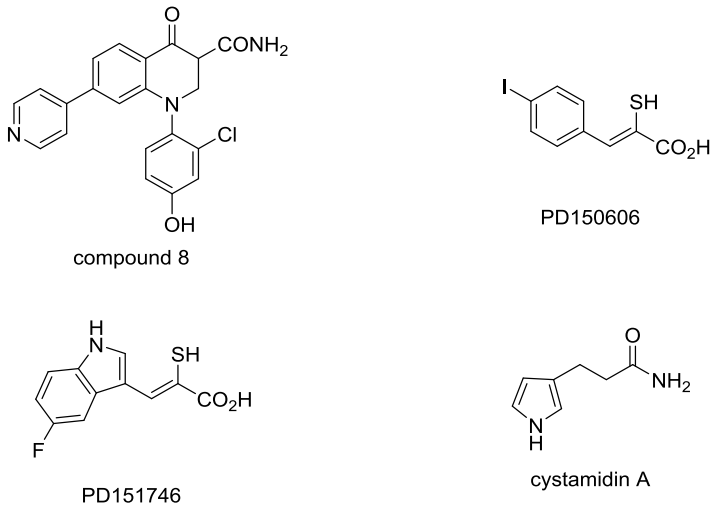


図 2.3 非ペプチド阻害薬の化学構造

そこで著者は、安全性および化学的安定性の観点から酵素阻害形式が拮抗阻害かつ可逆的阻害であり、アルツハイマー型認知症への適応を想定して経口投与で脳内に移行しやすい化合物を目標に設定した。

カルパイン阻害薬の研究アプローチは、図 2.4 に示すスキームにより行った。まず次項で述べる阻害薬の設計に基づき候補化合物を合成し、*in vitro* 阻害活性試験に供した。カルパインには、数十 μM の Ca^{2+}濃度で活性化する μ-カルパインと 1 mM 程度の濃度で活性化する m-カルパインが存在するが、実際の生体内ではその活性を促進する内因性の因子：熱安定因子や好中球の因子、イソバレリルカルニチンやリン脂質類等によりさらに低い Ca^{2+}濃度で活性化すると考えられている [13]。ラット脳より調製が可能な m-カルパインを用い、酵素の活性中心近傍の様子を反映すると考えられる合成基質法により *in vitro* 酵素阻害活性を測定した [31]。この際、酵素阻害活性は $K_i < 0.1$ μM を目標とした。なお、本章で構造と活性の相関を論じる際に用いた *in vitro* の酵素阻害活性の測定方法は、次の第Ⅲ章に詳述した。また、いくつかの化合物については、生体内での阻害に近いカゼイン法により併せて測定を行った。

1 μM 程度の K_i 値が得られた化合物については、カイニン酸の脳室内投与による MAP2 分解抑制効果を評価した。カイニン酸をラットの脳室内に投与するとイオンチャネル共役

型のグルタミン酸受容体に結合し、細胞内にカルシウムイオンが流入する結果、カルシウムイオンによりカルパインが活性化されカルパインの基質となる蛋白質である MAP2 を分解する。薬剤投与 24 時間後に海馬を摘出し、ウェスタンブロッティングにより MAP2 量を定量することにより化合物のカルパインの活性化抑制効果を評価した。

経口投与で 1 mg / kg にて有意に抑制効果を示した化合物について、さらなる薬理評価、安全性評価を行い開発候補化合物の絞り込みを行うこととした。

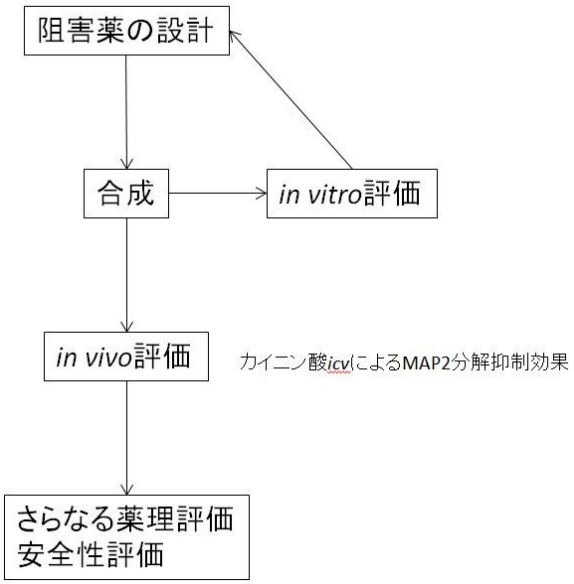


図 2.4 カルパイン阻害薬の研究アプローチ

2. ドラッグデザイン

図 2.1 のペプチジルアルデヒド（calpeptin, MDL28170）や図 2.2 のペプチジルハロメチルケトン（compound 4f, MDL201053）等の既知のシステインプロテアーゼ阻害薬の情報を参考に [49, 64]、新規システインプロテアーゼを設計した。図 2.5 に示す通り、標的酵素の活性部位を認識し酵素間の選択性を発現するペプチドユニット部分と、標的酵素の触媒部位（SH 基）と相互作用する部分をリンカーで結合すると標的酵素のみを選択的に阻害する化合物が得られると考えた。

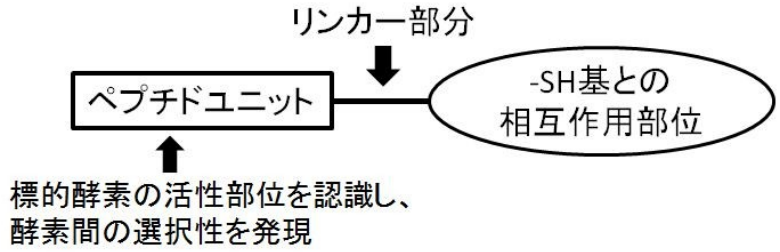


図 2.5 新規システインステインプロテアーゼのドラッグデザイン

標的酵素の触媒部位（SH 基）と相互作用する部分については、以下に述べるように今回新たに設計した。

シクロプロペノン環は、図 2.6 に示す通りプロトン受容体としての性質のみならず、求電子剤として作用する性質も併せ持っている。すなわち、シクロプロペノン環のカルボニル基のプロトン化により安定な 2π 芳香族性を有するヒドロキシシクロプロペニウムカチオン **4** を生じる前駆体であるとともに、種々の求核試薬に対して求電子剤として働き 1,2-付加あるいは 1,4-付加を受けたのち開環する [65]。

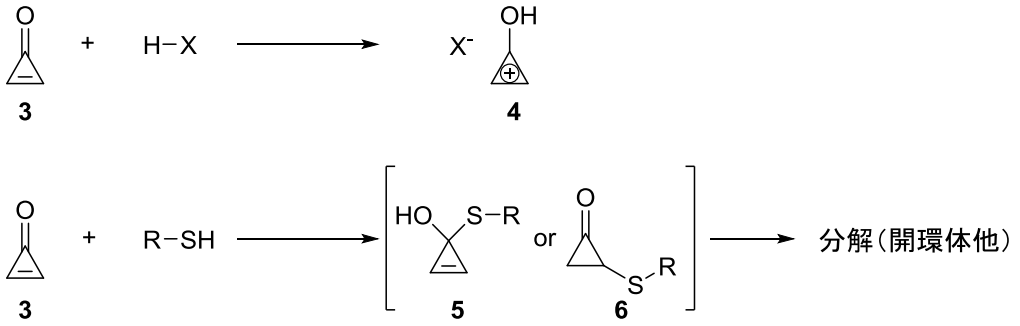


図 2.6 シクロプロペノン環の化学的性質

例えば、シクロプロペノンは酸性溶液中で容易にプロトン化されヒドロキシシクロプロペニウムカチオンとなることが報告されている（図 2.7）[66]。$CDCl_3$ 中ジフェニルシクロプロペノン **7** に 10 当量のトリクロロ酢酸あるいはトリフルオロ酢酸を添加すると、ヒドロキ

シシクロプロペニウムカチオン **8** の生成が ^{13}C NMR で観測される。**8** は 35 ℃で 2 日間安定であり、中和により定量的に出発物質 **7** が回収される。

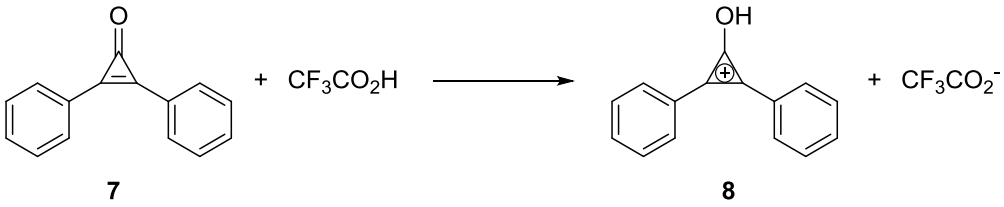


図 2.7 シクロプロペニウムカチオンの生成

求核試薬によるシクロプロペノン環への 1,2-付加については、図 2.8 に示す通り、**7** はジエチルアミンが 1,2-付加した後に開環し、良好な収率で化合物 **9** となる [67]。また、1,4-付加については、**7** は THF 中 0 ℃においてフェニルリチウムが 1,4-付加し、シクロプロペノレートアニオンを経て転位後加水分解によりケテン中間体 **10** を経て 18%の収率でカルボン酸 **11** となることが報告されている [68]。

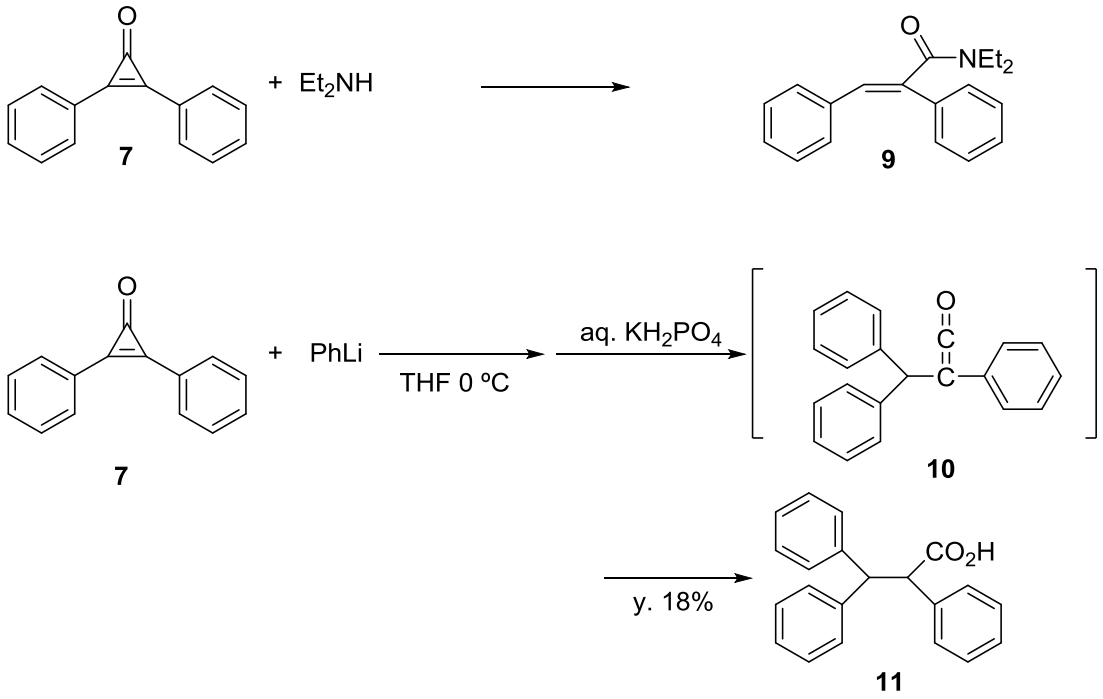


図 2.8 シクロプロペノン環の求電子剤としての性質

生理活性を有するシクロプロペノン誘導体は、本研究開始時には図 2.9 に示す抗生物質である天然物 penitricin およびその類縁体が[38, 69]、また研究開始後に図 2.10 に示す factor XIIIa 阻害薬である天然物 alutacenoic acid A および alutacenoic acid B が報告されているのみである[70]。alutacenoic acid B のフェネチルアミド誘導体は強い factor XIIIa 阻害活性を有し、factor XIII との共結晶構造解析により、シクロプロペノン環のカルボニル酸素が酵素活性部位の Trp279 のインドール NH と水素結合を形成していることが報告されている[70]。

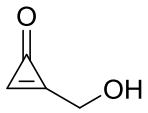


図 2.9 penitricin

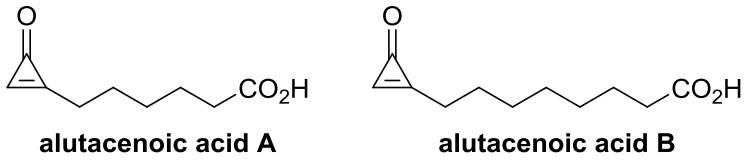


図 2.10 alutacenoic acid A および alutacenoic acid B

そこで著者は、システインプロテアーゼ選択的なペプチドユニットを用い、シクロプロペノン構造を有する新規システインプロテアーゼ阻害薬の設計を試みた。すなわち、シクロプロペノン環のヒドロキシシクロプロペニウムカチオンになる性質を利用すると、一般に pKa 9 ~ 12 の酸性度を示す SH 基とシクロプロペノン部位のカルボニル基が適当な距離関係にあればカルボニル基の SH 基によるプロトン化によりヒドロキシシクロプロペニウムカチオンが生成し、標的酵素活性中心表面とヒドロキシシクロプロペニウムカチオンとの間の強い静電相互作用により、可逆的に酵素活性を阻害することができるのではないかと考えた。また、求電子剤としての性質を利用すると、酵素活性中心の触媒部位のシステイ

ン残基の SH がシクロプロペノン環へ付加し、不可逆的に酵素活性を阻害できるのではないかと考えた。

プロテアーゼの基質ペプチドの各アミノ酸残基は，切断点より N-末端側へ $P_1, P_2, P_3 \ldots P_n$ と呼ばれ、基質ペプチドの各アミノ酸残基に対応する酵素上の部位は、$S_1, S_2, S_3 \ldots S_n$ と呼ばれる[71]。ペプチドユニットの設計については、既存のカルパイン阻害薬の構造を基に行った。すなわち、カルパインは P_2 位のロイシンを認識していることが知られており、阻害薬は P_2 位にロイシンを有する化合物が設計されている[72]。また、ペプチドユニットとカルパイン活性中心との相互作用については、本研究を開始した後に、カルパインと阻害薬の共結晶構造から多くの情報を得ることができた[73, 74]。フルオロメチルケトン **12**（Cbz-Leu-Leu-Tyr-CH_2F）とヒト μ-カルパインは、阻害薬のフルオロメチル基と Cys115 残基が求核置換反応することで共有結合を形成し、ケトンのカルボニル基が Gln109 残基の側鎖アミド基および Cys115 残基の NH 基と水素結合を形成している。さらに P_1 位の Tyr が Gly207 残基のメチレンと P_2 位の Leu が Ala273 残基のメチル基とそれぞれ相互作用をしている。また、末端の Cbz-Leu 部分は酵素外の溶媒中に存在し自由度の高いことが観察されている。

以上のように、酵素活性中心の表面に強い親和性を有すると考えられる既知のシステインプロテアーゼ阻害薬に含まれるペプチドユニットと酵素の触媒中心の SH 基との相互作用が期待されるシクロプロペノン環をリンカーユニットで結ぶことを新規システインプロテアーゼ阻害薬設計の基本コンセプト（図 2.12）とし、合成に着手した[75]。

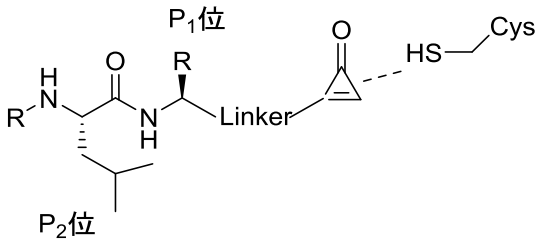


図 2.12 新規システインプロテアーゼ阻害薬設計の基本コンセプト

3. 探索合成段階での合成方法

シクロプロペノン誘導体の合成法については、これまで中村らによりシクロプロペノンアセタールのリチウム試薬 **13** とアルデヒド、ケトン、ハロゲン化物などの求電子試薬との反応が図 2.13 に示す通り開発されている[37]。

すなわち、無置換のシクロプロペノンアセタール **14** は、ジエチルエーテル-液体アンモニア中 1,3-ジクロルアセトンアセタール **15** に金属ナトリウムを作用させた後、プロトン源として塩化アンモニウムで反応を停止されると得られる。モノ置換体 **1** については、無置換体 **14** を HMPA 存在下 *n*-ブチルリチウムによりリチオ化し[36]、得られたリチウム試薬 **13** をハロゲン化物、アルデヒド、ケトンと反応させることにより **16**、**17**、**18** を 1 工程で合成することができる。また、リチウム試薬 **13** を塩化亜鉛との反応により亜鉛試薬 **19** へと金属交換した後に根岸カップリングによりビニル化、アリール化し **20**、**21** とすることもできる。モノアルキル置換体 **16** の別合成法としては、ジエチルエーテル-液体アンモニア中 1,3-ジクロルアセトンアセタール **15** に金属ナトリウムを作用させた後、プロトン源としてハロゲン化物で反応を停止することにより 1 工程で合成することもできる[40]。また、アルキル化反応を同様に繰り返すことにより、モノアルキル置換体 **16** はジアルキル置換体 **22** へ誘導される。

アセタールの脱保護はアセトン中 Amberlyst 15®を用い、シクロプロペノンアセタール **23** から目的とするシクロプロペノン **24** へ導くことができる。

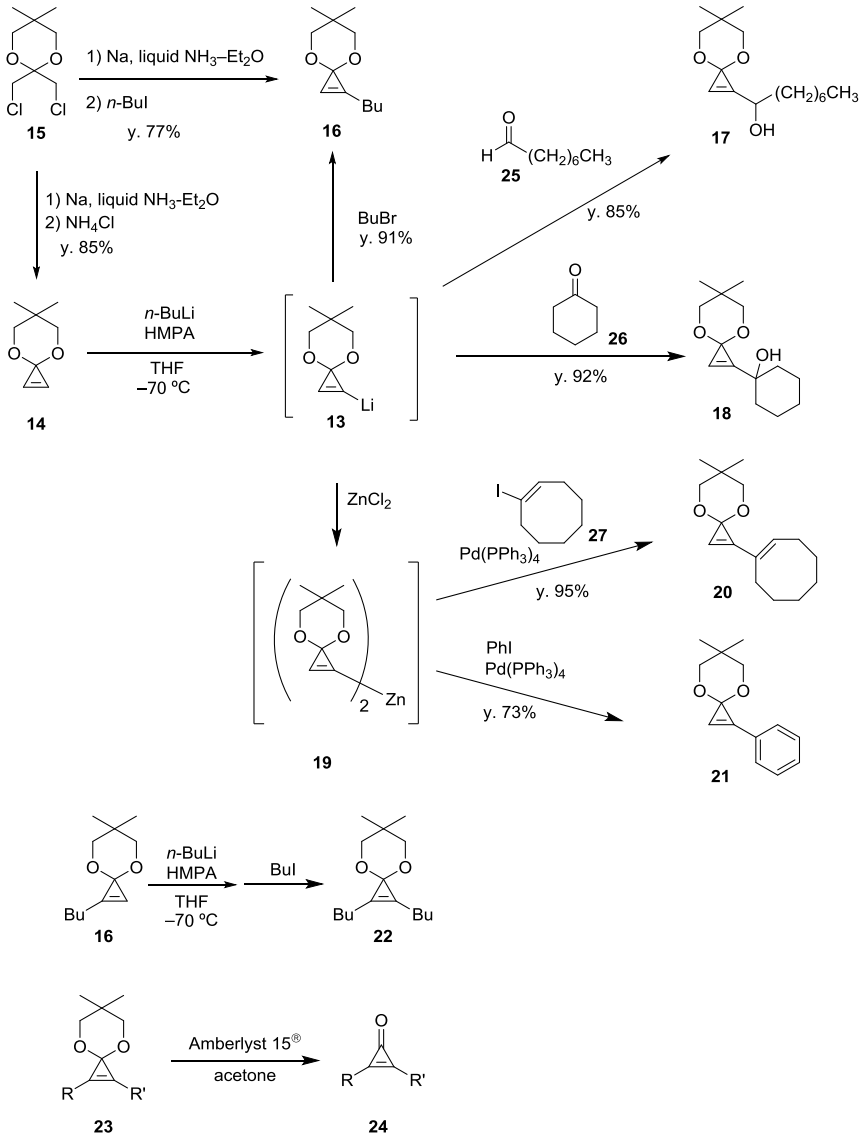


図 2.13 シクロプロペノン誘導体の合成法

前項で設計した阻害薬を合成するためには、シクロプロペノン環への置換基としてペプチドユニットを導入する方法を新たに考案する必要があった[76]。シクロプロペノン部位をアミノ酸の C 末側に導入するには、α-アミノアルデヒドへのシクロプロペノンアセタール金属試薬の 1,2-付加を用いれば良いと考えた。一般に α-アミノアルデヒドのカルボニル α 位は脱プロトン化されやすいので、次のように一旦生成させたリチウム試薬を塩基性の低いセリウム試薬へと金属交換させて反応を試みた。

すなわち、シクロプロペノンアセタール **1**[37, 40] を TMEDA 存在下でリチオ化し、無水塩化セリウムの THF 懸濁液を添加して塩化セリウムと金属交換した[77]。得られたセリウム試薬を α-アミノアルデヒド *N* 保護体 **28** と反応させたところ、アルコール **29** のジアステレオ混合物を得ることができた[75]。1′位の立体異性体比は ^{1}H NMR により 85 : 15 から 70 : 30 であることが観測された（1′位の絶対立体配置の決定は p30 で述べる）。

次に、段階的に脱保護を行った。まず、希硫酸あるいは希塩酸を作用させ温和な酸性条件でアセタールを除去した。次に 1 当量のトシル酸一水和物または過剰の塩酸を反応させ *N*-Boc 基を脱保護し、トシル酸塩または塩酸塩 **30a**, **30b** とした。R^2 がアリール基の場合、1 当量の水存在下で 3 M 塩酸-ジオキサン混合液を作用させるとアセタール基と Boc 基の脱保護が同時に進行した。

ロイシン誘導体 **31** と、アミン **30** のジアステレオ混合物とのカップリング反応は以下の通り行い、目的物 **32a**, **32b** を合成した。すなわち、ロイシン誘導体 **31** をトリエチルアミン存在下クロロギ酸イソブチルで活性化し、生成した混合酸無水物をアミン **30** のジアステレオ混合物と反応させ目的物 **32a**, **32b** とした。この段階でいくつかの化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより立体異性体を分離することができた。

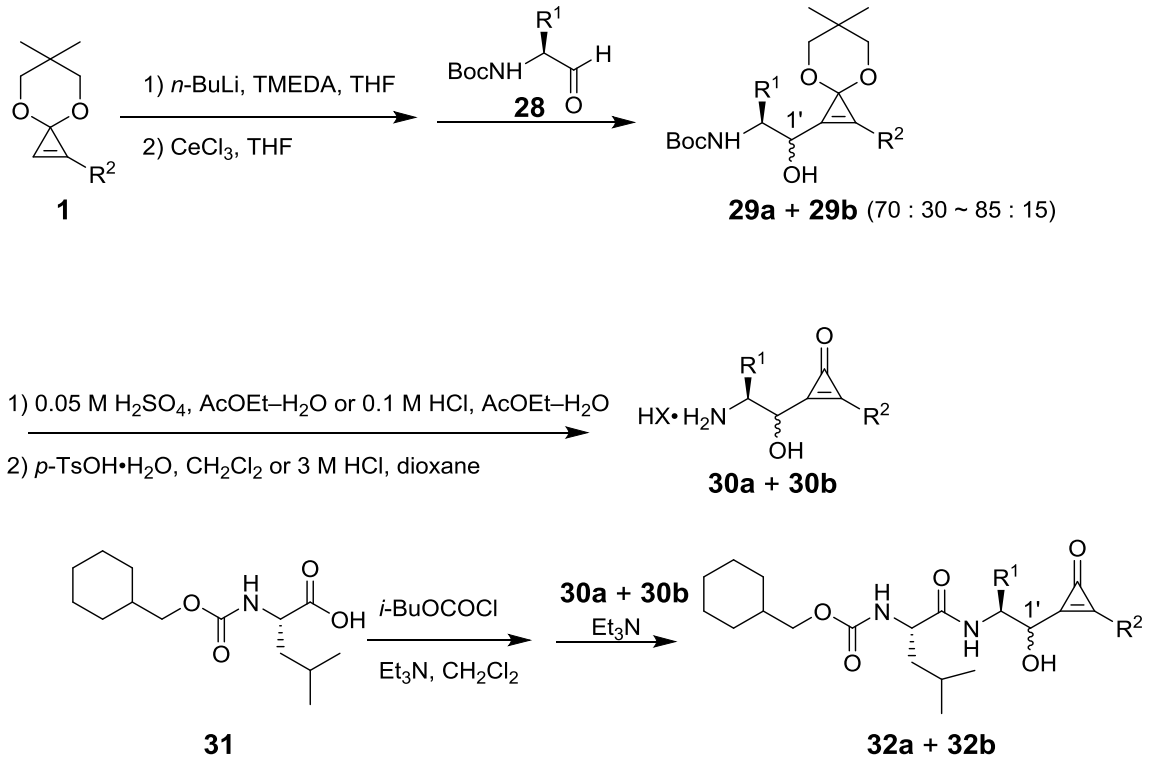
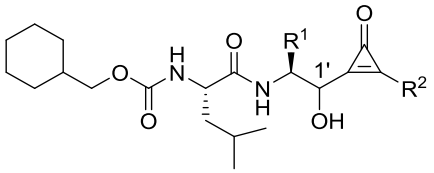


図 2.14 設計した阻害薬の一般的な合成ルート

4. シクロプロペノン環の置換基選択

探索当初に見出されたR^2の無置換体**33**および**34**のジアステレオ混合物は、m-カルパイン阻害活性のIC_{50}がそれぞれ0.50 μM、0.81 μMと強いものであった（表2.2）が、第Ⅳ章第3項で後述する通り合成中間体**1**（R^2 = H, **14**）は熱的に不安定であり、大量合成が困難であった。そこで、合成中間体が安定でありm-カルパイン阻害活性を示す化合物を探索するため、表2.2に示す通りシクロプロペノン環の置換基R^2の効果を検討した。



32

表 2.2 化合物 **32** の m-カルパイン阻害活性

化合物	R^1	R^2	IC_{50} (μM)	(1′*S*) : (1′*R*)[a]
33a, **33b**	$CH(CH_3)_2$	H	0.50	7:3
34a, **34b**	$CH_2CH_2CH_2CH_3$	H	0.81	8:2
35a, **35b**	$CH_2CH_2CH_2CH_3$	CH_3	40.0	6:4
36a, **36b**	$CH_2CH_2CH_2CH_3$	$CH_2CH(CH_3)_2$	> 200	6:4
37a	$CH_2CH_2CH_2CH_3$	(Z)-1-Hexenyl	56.0	(1′*S*)[c]
38a	$CH(CH_3)_2$	Phenyl	1.62	(1′*S*)[c]
38b	$CH(CH_3)_2$	Phenyl	3.25	(1′*R*)[b]
39a, **39b**	$CH_2CH_2CH_2CH_3$	Phenyl	2.70	7:3
40a	$CH(CH_3)_2$	4-F-Phenyl	1.51	(1′*S*)[c]
40b	$CH(CH_3)_2$	4-F-Phenyl	7.00	(1′*R*)[b]
41a, **41b**	$CH_2CH_2CH_2CH_3$	2-Me-Phenyl	29.0	7:3
42a, **42b**	$CH_2CH_2CH_2CH_3$	5-Trimethylsilyl-2-thienyl	11.0	7:3

[a]NMRにより決定、[b]X線結晶構造解析により決定[76]、[c]付加反応の立体選択性より推定

R^2にアルキル置換基を持つ誘導体**35a, 35b**の混合物および**36a, 36b**の混合物はそれぞれ対応する合成中間体が安定であったが、そのm-カルパイン阻害活性は無置換体**33a, 33b**の混合物および**34a, 34b**の混合物と比較し極めて弱いものであった。しかし、シクロプロペノン環と共役しているヘキセニル置換体**37a, 37b**の混合物は、立体的により小さな**36a, 36b**の混合物より阻害活性が強かった。また、芳香族置換体の**38a**～**42a, 42b**は、立体的に嵩高いにもかかわらず化合物**41a, 41b**の混合物を除き良好な阻害活性を示した。

上記の阻害活性の置換基R^2による変化については、電子的効果および立体的効果の観点から次のように考察を行った。著者らは、酵素阻害活性の発現においてシクロプロペノン環のプロトン化により生じるヒドロキシシクロプロペニウムカチオン**4**が重要な役割を果たすという仮説を提唱している。ヒドロキシシクロプロペニウムカチオンの安定化に対し、アルキル置換基による電子供与性のσ 誘起効果が芳香族置換基によるπ電子共役効果より

重要であることが報告されていること[78]、およびジ*n*-プロピルシクロプロペノンがジフェニルシクロプロペノン**7**よりやや塩基性が強いことを考慮すると[79]、アルキル置換体の方が良好な阻害活性を示しても良いと考えられる。しかしながら、アルキル置換基の阻害活性は芳香族置換基より弱く、シクロプロペノン環の置換基の電子的な効果はそれほど重要でないと考えられた。

次にシクロプロペニウムカチオンの共鳴による安定化について考察した。化合物**38a**および**38b**のシクロプロペノン環とベンゼン環のコンフォメーションは、**38b**の単結晶X線構造解析より[76]ジフェニルシクロプロペノン**7**[80, 81]およびビス*p*-クロロフェニルシクロプロペノン[82]の報告と同様にほぼ平面であることが分かり、強い共鳴安定化の効果があると考えられる。一方、化合物**41a, 41b**の混合物における活性強度の減弱は、ベンゼン環のオルト位にメチル基を有するためベンゼン環とシクロプロペノン環が平面性を保つことができず共鳴の安定化が減少したことによると推察される。以上のように、アリール基によるシクロプロペニウムカチオンの共鳴安定化が阻害活性に大きく寄与しているものと考えられる。

以降の検討において、シクロプロペノン環の置換基R^2は、化合物の高い阻害活性と合成中間体の安定性を考慮しフェニル基を選択した。

5. 1′位の絶対立体配置とペプチドユニットの最適化

α-アミノアルデヒド*N*保護体への1,2-付加により生じたジアステレオ混合物**32a**, **32b**の1′位の立体異性体の分離は総じて困難であったが、R^1がイソプロピル基の場合には、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて比較的容易に分離することができた。マイナーな異性体**38b**の1′位の絶対立体配置は単結晶X線構造解析により(1′*R*)であると決定されている[76]。表2.2に示す通り、検討したすべてのケースにおいて、(1′*S*)-体は (1′*R*)-体より、2～4倍阻害活性が強かった。

また、化合物**38a**および**38b**の他のシステインプロテアーゼの阻害活性を表2.3にまとめた。(1′*S*)-体**38a**はパパイン、カテプシンB、カテプシンL[83]に対し強い阻害活性を示した。一方、

(1′*R*)-体**38b**はカテプシンBおよびカテプシンLを強く阻害したが、パパインに対しての阻害活性は弱かった。この結果から、パパインの阻害には1′位の水酸基の立体化学が非常に重要であることが分かる。また他のクラスの酵素の阻害活性を検討すると、**38a**はセリンプロテアーゼ（トロンビン[84]とカテプシンG[85]）、アスパラギン酸プロテアーゼ（カテプシンD[86]）を100 μMの高濃度でも阻害しないことが明らかになった。従って、これらの一連の化合物は選択的なシステインプロテアーゼの阻害薬であると推定される。

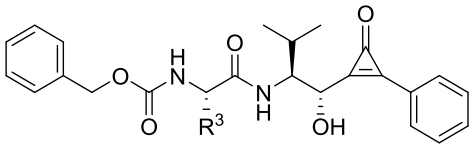
表2.3 化合物**38a**および**38b**のシステインプロテアーゼの阻害活性

酵素	IC_{50} (μM)		
	38a	**38b**	**38b** / **38a**
m-カルパイン[a]	1.62	3.25	2.01
パパイン[b]	0.054	22	407
カテプシン B[c]	0.71	0.044	0.06
カテプシン L[d]	0.00086	0.0013	1.52

[a]ラット脳より精製、[b]パパイヤより精製、[c]ウシ脾臓より精製、[d]ラット腎臓より精製

化合物**32**のカルパインへの結合サイトは不明であったが、R^1が酵素のS_1位に結合し、ロイシン部位がS_2位に結合すると推定している。この仮説を検証するために、表2.4に示す通り、化合物**43**におけるR^3の置換基効果を検討した。

なお、シクロプロペノン環がカルパインを可逆的あるいは不可逆的に阻害しているかについては、第Ⅲ章第2項に後述した。



43a

表2.4 化合物**43a**の阻害活性

化合物	R^3	IC_{50} (μM)	
		m-カルパイン	カテプシン B
44a	CH_3	48.0	22.9
45a	$CH(CH_3)_2$	8.20	9.45
46a	$CH_2CH(CH_3)_2$	2.10	29.0
47a	CH_2Ph	16.2	> 100

検討した4つの置換基のうち、イソブチル基（ロイシン）がm-カルパインに対して最も強い阻害活性を示した。カルパインは、P_2位のロイシンを認識していることが知られており、leupeptin等カルパイン阻害薬はP_2位にロイシンを有する化合物が設計されている[72]。一方、カテプシンBに対する阻害活性は、m-カルパインとは異なる傾向を持っていた。

以上の結果から、化合物**32**および**43a**の酵素への結合サイトは、図2.15に示す通り、S_3にシクロヘキシルメチル基およびベンジル基（R^4基）が、S_2にイソプロピル基（R^3基）が、S_1にイソブチル基（R^1基）が対応すると推察される。2-フェニルシクロプロペノン[37]や2-(1-ヒドロキシヘキシル)-3-フェニルシクロプロペノン[38]等の単純なシクロプロペノン誘導体は200 μMの高い濃度でも阻害活性を示さないことから、ジペプチドユニットの重要性は明らかである。

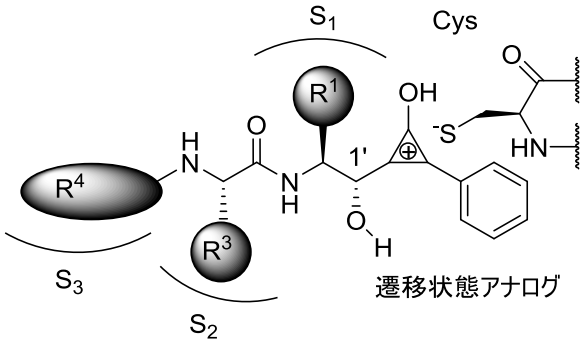


図2.15 阻害薬の結合様式の推定

また、1′位の水酸基については、酵素阻害活性に影響していることからその位置および立体から酵素反応における遷移状態アナログになっているのではないかと考えた。そこで、最後に1′位の水酸基の修飾について検討した。化合物**32**の1′-アセトキシ体には阻害活性が認められなかった。また、1′-ケト体の合成をさまざまな方法で試みたが、ヒドロキシル基からオキソ基への酸化反応において2′位に水素原子が有るために脱水反応が進行すると考えられ、成功しなかった。そのため、2′-ジメチル体**48a**, **48b**の混合物および水酸基を酸化した1′-ケト体**49**を図2.16に従い合成した。**48a**, **48b**の混合物の阻害活性は図 2.17に示す通り、2′位の置換基効果のため阻害活性は弱く、**49**の阻害活性は**48a**, **48b**の混合物よりさらに減弱していた。従って、1′位の水酸基はm-カルパインの阻害活性に重要な役割を果たしていると結論した。

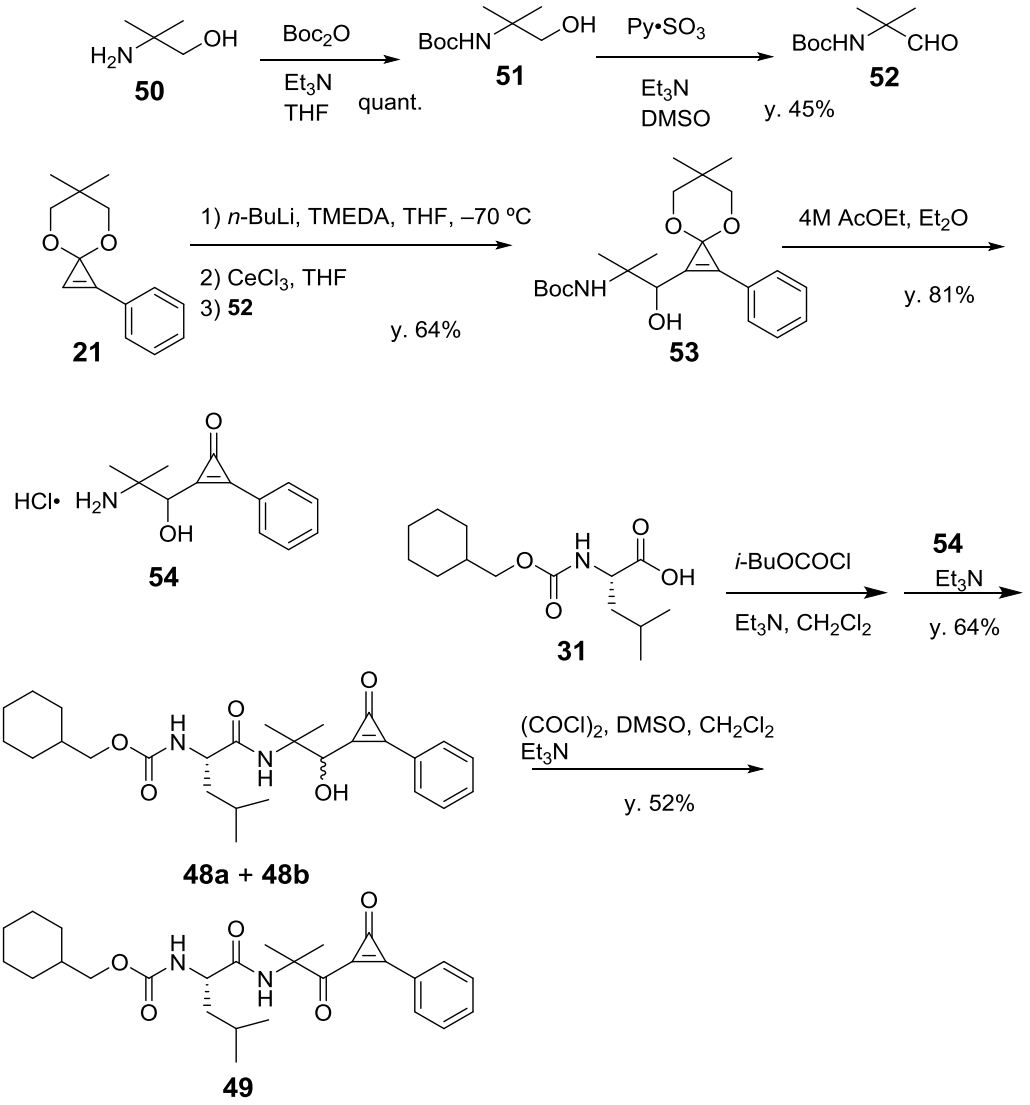
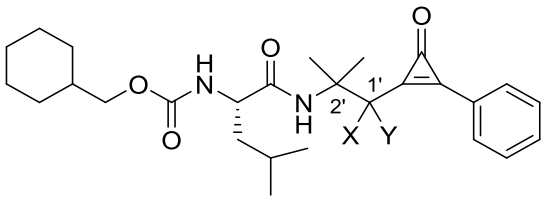


図2.16 化合物**48a**, **48b**の混合物および**49**の合成



48a, **48b:** X = H, Y = OH; IC_{50} = 42.0 μM
49: X, Y = (=O); IC_{50} > 100 μM

図2.17 化合物**48a, 48b**の混合物および**49**のm-カルパイン阻害活性

以上の結果から、ジペプチドユニットについては、基質特異性の観点よりR^3にイソブチル基を、酵素の阻害活性および付加反応により生じる1′位の立体異性体の分離の観点よりR^1にイソプロピル基を選択し、ロイシン-バリンの構造に最適化した。また、1′位の炭素原子の絶対立体配置については(*S*)-体を選択した。

6. アミノ置換基の変換

次に、シクロプロペノン誘導体 **55a** のアミノ基上の置換基 R^4 について、図 2.14 に従い前項で合成したシクロヘキシルメトキシカルボニル基およびベンジルオキシカルボニル基の他、図 2.18 の方法で合成したアシル基、スルホニル基および他のアルコキシカルボニル基の化合物について検討した（表 2.5）[87]。

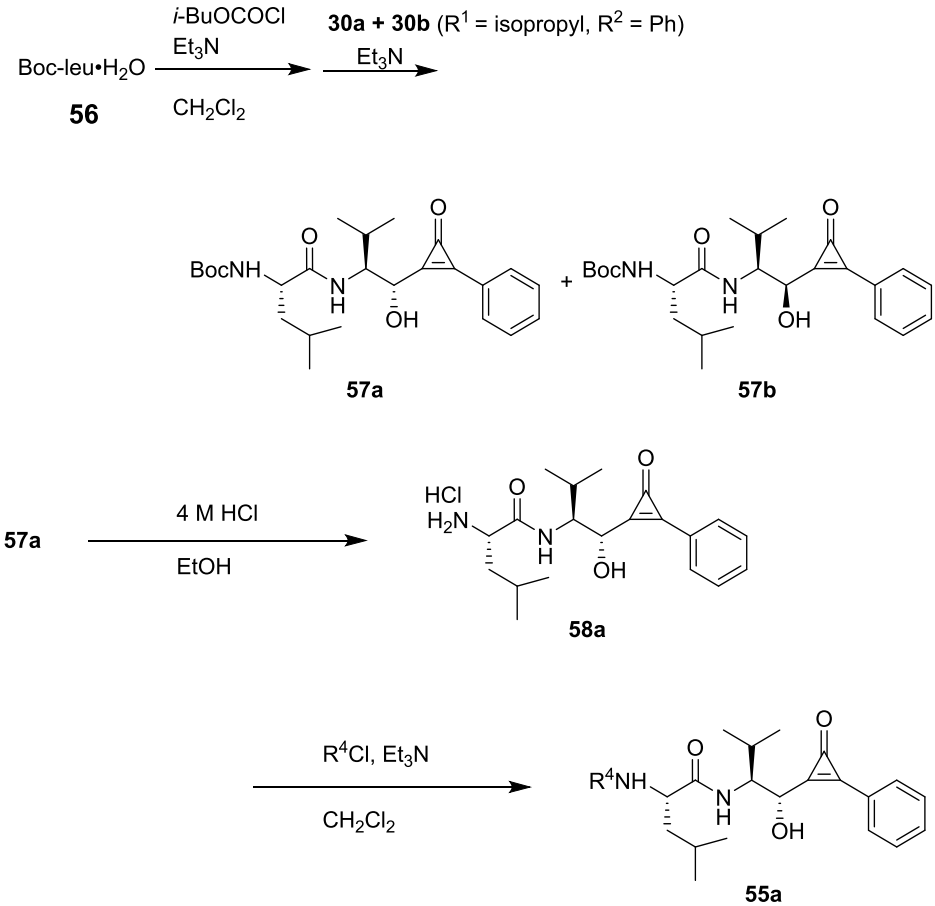
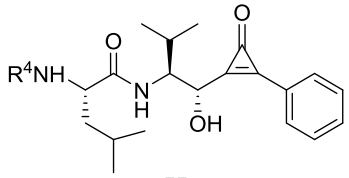
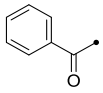
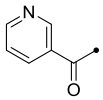
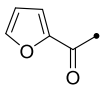
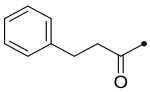
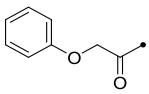
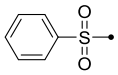
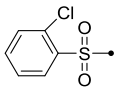
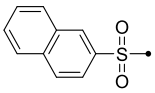
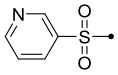
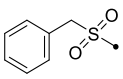
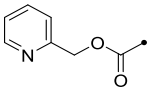


図 2.18 化合物 **55a** の合成法

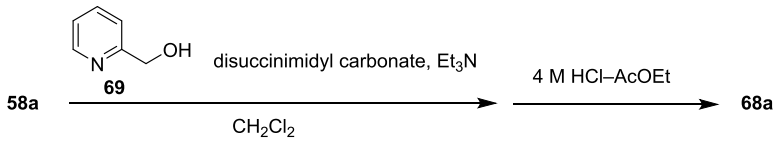
表 2.5 アミノ置換基 R^4 の変換



55a

化合物	R^4	単離収率（%）	IC_{50} (μM)
アシル基			
59a		81	6.8
60a		84	1.3
61a		84	0.88
62a		80	1.50
63a		77	0.63
スルホニル基			
2a		64	0.35
64a		41	0.85
65a		84	0.46
66a		91	0.24
67a		66	0.44
アルコキシカルボニル基			
68a[a]	 ·HCl	57	1.7

[a] **68a** のみ下記の通り合成した



その結果、表 2.5 に示す通り化合物 **2a** および **66a** に優れた *in vitro* 活性が認められた。化合物 **66a** は **2a** に比し logP が 2.3 から 1.9 に低減しており、水溶解度を測定したところ、化合物 **2a**（0.011 mg / ml）の 17 倍（0.19 mg / ml）水溶解度が向上していた（表 2.6）。最終的に化合物 **2a** (BDA–410)を開発候補化合物として選択した。

表 2.6 化合物 **2a**　(BDA–410), **66a** の水溶解度および logP

	化合物 **2a**	化合物 **66a**
水溶解度	0.011 mg / ml	0.19 mg / ml
logP (HPLC 法)	2.3	1.9

また、BDA–410 についても単結晶 X 線構造解析を行い、ロイシン・バリンの絶対立体配置との比較から 1′位の絶対立体配置が(1′*S*)であることと確認した。

7.　まとめ

細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇により活性化し、神経変性疾患をはじめとする多くの病理現象に関与していると考えられるカルパインを創薬ターゲットに、新規阻害薬の探索研究を行った。特に、著者らは Nixon 博士の提唱するアルツハイマー型認知症のカルパイン仮説に則り、その予防・治療薬の開発を目指した。

既存のカルパイン阻害薬はいずれも毒性、化学的な安定性、生体内での安定性等に課題が有りこれまで実用化に至っていない。そこでこれまでにない全く新しいコンセプトによる阻害薬の開発を目指した。具体的には、シクロプロペノン環がプロトン受容体および求電子剤のふたつの化学的性質を有することに着目し、特にこの骨格が酵素触媒部位の SH 基

と強い相互作用することにより可逆的な阻害薬となることを期待した。また、酵素活性中心の表面と阻害薬との相互作用には、既知のペプチド誘導体である阻害薬の構造情報を活用することとした。

設計した阻害薬の合成については、シクロプロペノンアセタールの金属試薬を α-アミノアルデヒド *N* 保護体に 1,2-付加させる鍵反応を開発し、その結果、高活性を有するシステインプロテアーゼ阻害薬を見出した。シクロプロペノン環上の置換基として、阻害活性および化合物の安定性の観点からフェニル置換基を、酵素の S_1 位との結合するアミノ酸として阻害活性と立体異性体分離の観点からバリンを、S_2 位と結合するアミノ酸としてロイシンを選択した。1′位の水酸基は(*R*) 体に比べ(*S*) 体により強い阻害活性が認められた。

さらに、アミノ基上の置換基について、アシル基、スルホニル基、アルコキシカルボニル基を検討し、スルホニル基を有する化合物 **2a** を開発候補化合物 BDA–410 として選抜した。

第Ⅲ章　システインプロテアーゼ阻害薬開発候補化合物 BDA–410 の作用機序と生理活性

1.　序

本章では、前章で設計・合成した開発候補化合物 BDA–410 の酵素阻害の様式および選択性について検討した。

なお、開発候補化合物 BDA–410 は、薬理研究所および外部の研究機関でアルツハイマー型認知症の他、マラリア、筋ジストロフィー等の種々の動物モデルで評価され、良好な薬理作用が報告されており [88–90]、本章第 4 項に補足として記述した。

2.　BDA–410 の m-カルパインに対する阻害様式および選択性の検討

BDA–410のm-カルパインに対する阻害メカニズムを解析するため、化合物**38a**をモデル化合物として用いm-カルパインに対するLineweaver‐Burkプロットを常法にて作成した。なお、m-カルパインの阻害活性は、合成基質（Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, MCA = 4-methylcoumaryl-7-amide）を用い、文献記載の方法[91]に従い測定した。m-カルパインに対する化合物**38a**の阻害は拮抗阻害であり、K_i値は0.50 ± 0.126 μMであった。また、パパインに対しても同様に拮抗阻害であり、K_i値は0.055 ± 0.229 μMであった。

シクロプロペノン環の反応性を考慮すると、酵素を不可逆的に阻害している可能性も考えられ、この点を明らかにするためBDA–410のモデル化合物として**38a**および**39**を用い以下の実験を行った[92]。m-カルパインに対する阻害メカニズムを解析するため、m-カルパイン、合成基質（Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA）および阻害薬に塩化カルシウムを加え高濃度で5 ~ 20分間インキュベートした後、カルシウムキレーターであるEDTAを加え酵素の反応を終結した。次に反応溶液を緩衝液で希釈し、塩化カルシウムと合成基質を過剰量加え再度酵素を活性化し残存する酵素活性を測定した。不可逆的阻害薬として知られているE–64[93]がインキュベーション時間に比例して残存する酵素活性が減少したのに対し、化合物**39**のジアステレオ混合物は、残存する酵素活性が対照群に比し変化しなかった。以上のことから化合物

39のジアステレオ混合物はm-カルパインの可逆的阻害薬であり、また、同様の実験で化合物**38a**も可逆的阻害薬であった。

つぎに開発候補化合物 BDA–410 の酵素選択性を検討した。BDA–410 は、カルパインを選択的に阻害（μ-カルパイン；K_i = 130 nM, m-カルパイン；K_i = 630 nM）し、カテプシン B（IC_{50} = 16 μM）に対して選択的阻害作用を有した。また、システインプロテアーゼ以外の酵素（セリンプロテアーゼ：トロンビン; IC_{50} > 100 μM・カテプシン G; IC_{50} > 100μM、アスパラギン酸プロテアーゼ：カテプシン D; IC_{50} = 91.2 μM）の阻害活性は極めて弱いものであった（表 3.1）。

表 3. 1 BDA–410 の酵素阻害活性

分類	酵素	由来	阻害活性
システインプロテアーゼ	μ-カルパイン	ブタ赤血球	K_i = 130 nM
	m-カルパイン	ブタ腎臓	K_i = 630 nM
	カテプシン B	ウシ脾臓	IC_{50} = 16 μM
セリンプロテアーゼ	トロンビン	ウシ血漿	IC_{50} > 100 μM
	カテプシン G	ヒト白血球	IC_{50} > 100μM
アスパラギン酸プロテアーゼ	カテプシン D	ヒト肝	IC_{50} = 91.2 μM

3. （補足）BDA–410 の *in vivo* 薬理評価

BDA–410 は薬理部門で、カイニン酸脳室内投与による海馬フォドリン分解抑制作用および神経細胞死抑制作用、前脳基底部破壊モデルにおける受動回避反応が *in vivo* にて評価された [95]。

アルツハイマー型認知症モデルに対する効果については、APP / PS1 ダブルトランスジェニックマウスを用いた評価結果が、報告されている [88]。

BDA–410 は、一般毒性試験、催奇形性試験、癌原性予測試験において安全性上の問題は見出されなかった。

4. まとめ

開発候補化合物 BDA–410 はカルパインを選択的に阻害し、システインプロテアーゼであるカテプシン B に対し選択的阻害活性を有し、セリンプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ等システインプロテアーゼ以外の酵素の阻害活性は極めて弱いものであった。

つぎに、カルパインに対する酵素阻害様式を検討したところ、拮抗的かつ可逆的阻害であることが明らかになった。また、細胞内での阻害メカニズムについては、カルパインの膜への移行を阻害する作用および活性型カルパインの基質切断作用を抑制する作用を併せ持つことが明らかになった。

また、BDA–410 は経口投与で脳内のカルパイン阻害活性を示し、アルツハイマー型認知症モデル動物で有効であったことに加え、安全性上の問題も見いだされなかった。

第Ⅳ章　開発候補化合物 BDA–410 の実用的合成法の開発

1.　序

著者は、開発候補化合物 BDA–410 **2a** の高次薬効試験および毒性試験を実施するため、キログラムスケールでの合成法の開発に着手した。

探索合成時の合成法を図 4.1 に示す。まず、マロン酸ジエチル **70** をフェニル酢酸クロリド **71** と縮合し、中間体 **72** を脱炭酸してフェニルアセトン **73**（覚せい剤原料研究者、指定番号第 3604 号、神奈川県）とし、蒸留精製を行った。その後、塩化スルフリルによりベンジル位をクロル化し、得られたクロルケトン **74** をアセタール化しアセタール **75** に変換した。さらにアセタール **75** の 3 位をブロム化し **70** より 3 工程にてジハロケトンアセタール **76** とした。次に **76** に液体アンモニア中ナトリウムアミドを作用させてフェニル置換シクロプロペノンアセタール **21** とした。重要中間体 **21** を *n*-ブチルリチウムによりリチウム試薬を経由してセリウム試薬を生成させ、α-アミノアルデヒド **77** と反応させ、生成物をカラムクロマトグラフィーで精製して **78a**, **78b** の混合物を得た。**78a**, **78b** を脱保護し塩酸塩 **79a**, **79b** の混合物とした後、Boc-ロイシン一水和物 **56** と縮合しカラムクロマトグラフィーで精製することにより **57a** とした。**57a** を脱保護し塩酸塩 **58a** とした後、ベンゼンスルホニルクロリド **80** を作用させることにより目的物である開発候補化合物 BDA–410 **2a** を得た。

大量合成にあたっては、化合物 **73** の蒸留精製、化合物 **76** から **21** への反応での液体アンモニア溶媒の使用、熱的に不安定な重要中間体 **21** の使用、その付加反応における **78a**, **78b** のジアステレオ選択性、化合物 **21**, **78a**, **57a** のカラムクロマトグラフィーでの精製などの課題があったため、これらを改善・回避する実用的な合成法が必要であった。

実験室レベルでの実用的な合成法を確立後、前臨床試験用原薬製造のためプロセス検討部門でさらに製法の検討が行われ、原料の変更および試薬の添加順序を最適化して実用的な合成法を確立し、10 工程で数十 kg の原薬を製造することに成功している。

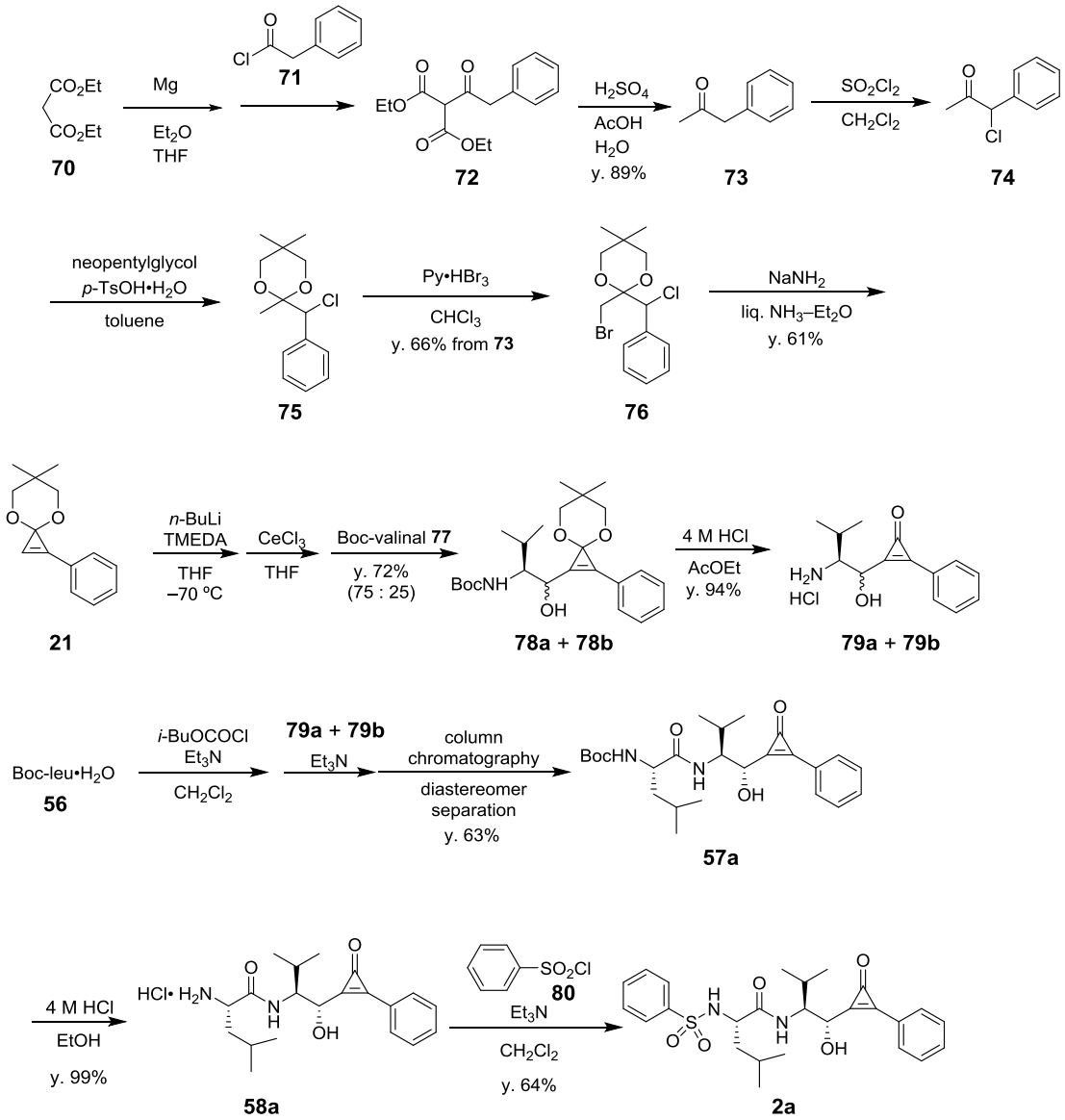


図 4. 1 探索合成時の合成方法

2.　液体アンモニア溶媒を回避する合成法の開発

これまで、フェニル置換シクロプロペノンアセタール **21** は、液体アンモニアを溶媒に用い、α, α′-ジハロケトンアセタールに ナトリウムアミドを作用させ合成していた[40]。この方法では、液体アンモニアの取り扱いに特別な配慮が必要であり、また腐食性かつ塩基性の液体アンモニアを廃棄時に中和する必要があった。そこで、著者らはフェニル置換シクロプロペノンアセタール **21** の簡便な合成法を検討した。

出発物質として、図 4.2 に示す通りフェニルアセトン **73** より 3 段階で容易に調製されるジハロケトンアセタール **76** を選んだ。フェニルアセトン **73** は、塩化メチレン中やや過剰の塩化スルフリルによりベンジル位がクロル化され、得られた α-クロルケトン **74** は、パラトルエンスルホン酸の存在下トルエン中加熱還流し通常の共沸脱水操作により対応するアセタール **75** に変換した。その後クロル化アセタール **75** にクロロホルム中でピリジニウムブロミドペルブロミドを加え加熱還流し、ブロム化した化合物 **76** を 3 段階通算 66%の収率で得た。生成する臭化水素で反応液が酸性条件になりアセタールの分解が起こるため、クロロホルムの加熱還流により即座に臭化水素を系外に除去した。

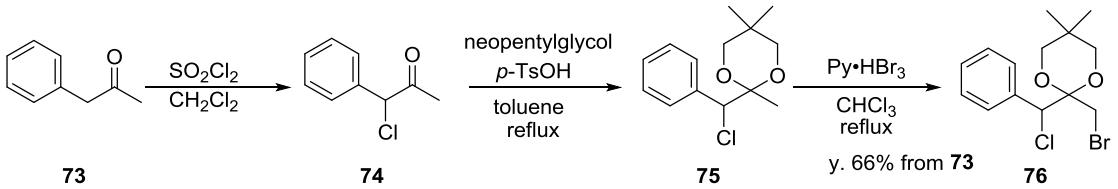
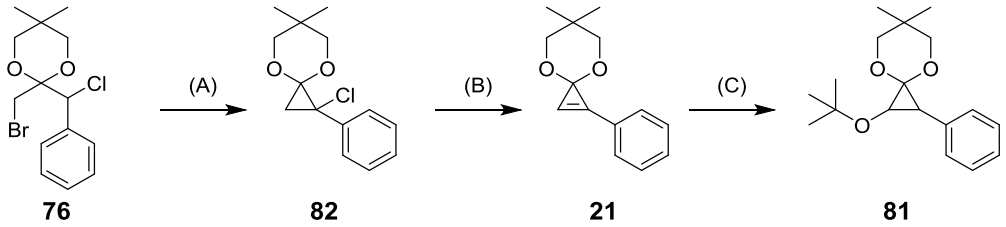


図 4.2 出発物質 **76** の合成

アンモニア中ナトリウムアミドを用いる条件以外のアセタール **76** の環化条件を検討するため、種々の強塩基を作用させた。THF 中、DBU、 ナトリウムアミド、水素化ナトリウム、ナトリウムメトキシド、 ナトリウムイソプロポキシドを作用させたが、望む反応は全く進行しなかった。なお、後述するように目的物 **21** が 87 ℃で分解するため、反応温度は室温以下で行った。また、THF 中 TMEDA 存在下に *n*-ブチルリチウム、あるいは DMF 中水素化ナトリウムを作用させたところ、複雑な混合物を与えるのみであった。

一方、THF 中 2 当量の *t*-BuOK を作用させたところ、興味深い結果を得た。すなわち、得られた混合物に目的のシクロプロペノンアセタール **21** と原料 **76** の他、*t*-ブタノール付加体 **81** が含まれていた。この反応機構は次のように説明できる。最初に、ベンジル位の脱プロトン化が起こり、分子内 S_N2 反応により環化体 **82** が生成し、引き続き脱塩化水素が起こり、目的物 **21** が得られる。さらに、**21** に *t*-ブトキシドが付加して **81** が生成したと考えら

れる（図 4.3）。環化体 **82** を経て目的化合物 **21** が得られると考えた根拠として、単離した中間体 **82** に THF 中 1 当量の *t*-BuOK を作用させると 79%の単離収率でシクロプロペノンアセタール **21** が得られた。また、**81** が **21** に対し *t*-BuOK が付加して生成したことは、シクロプロペノンアセタール **21** に THF 中 1 当量の *t*-BuOK を作用させると良好な収率で付加体 **81** を得たことからも示された。なお、付加体 **81** の立体については、2, 3 位の ^{1}H NMR の結合定数が 4.9 Hz であることからトランス体であると推定した。



76 **82** **21** **81**

図 4. 3 アセタール **76** の反応

上記の反応では、環化（A）、脱離（B）、付加（C）の三種類の異なる反応が順次進行しており、反応条件によってこれらをうまく制御できるのではないかと考え、溶媒および添加物の検討を行ったところ、表 4.1 に示す通り、興味深い結果が得られた。

塩基として 2 当量の *t*-BuOK を、溶媒として THF を用いると脱離反応（B）が早く、目的物 **21**、付加体 **81** および原料 **76** の約 1 : 1 : 1 の混合物が得られた（entry 1）。過剰の塩基（2.6 当量）を用いると付加体 **81** のみが得られた（entry 2）。次に溶媒を検討したところ、*t*-BuOH 中ではまったく反応は進行せず（entry 3）、NMP あるいは DMI を溶媒に用いた場合、おそらく環化反応（A）が速いため、主に環化体 **82** および目的物 **21** が得られた（entries 4, 5）。

続いて、添加剤の影響についても検討を行った。THF 中基質に対して 1 当量の DMI を用いた場合、目的の **21** の収率が 88%と満足する結果を得た（entry 6）。しかし、DMF、TMEDA を用いた場合、**76** の残存と **81** の生成も見られるなど良好な結果は得られなかった（entries

7, 8)。また、溶媒として THF と DMI の 1 : 1 混合溶液を用いた場合も **82** と **81** が少量生成したものの良い結果を得た（entry 9)。

表 4.1 反応条件の検討[a]

entry	溶媒	*t*-BuOK の当量	添加物（当量）	反応条件	生成比率 %[b]			
					76	**82**	**21**	**81**
1	THF	2.0	none	rt, 3 hr	32	0	36	32
2	THF	2.6	none	rt, 5 hr	0	0	0	100
3	*t*-BuOH	2.0	none	rt, 15 hr	100	0	0	0
4	NMP[c]	2.0	none	rt, 3 hr	0	22	66	12
5	DMI	2.0	none	rt, 3 hr	0	23	72	5
6	THF	2.0	DMI (1.0 eq.)	rt, 1 hr	8	0	88	4
7	THF	2.0	DMF (3.0 eq.)	rt, 1 hr	15	0	72	13
8	THF	2.0	TMEDA (3.0 eq.)	rt, 3 hr	21	0	40	39
9	THF–DMI	2.0	none	rt, 5 hr	0	11	86	3

[a] 全ての反応は 0.30 mmol スケールで実施　[b] ^{1}H NMR より決定した　[c] 反応混合物がすぐに赤色に変色

次に単離収率を確認した。ジハライド **76** を THF および DMI の 1 : 1 混合溶媒中 2 当量の *t*-BuOK を作用させ、得られた粗生成物をカラムクトマトグラフィーで精製すると、目的とするシクロプロペノンアセタール **21** が 70%の収率で得られた（図 4.4)。この収率は、液体アンモニア中ナトリウムアミドを作用させた反応で得られた単離収率 61%と同等である。また、粗精製物を *n*-ヘプタン から再結晶すると純粋な化合物を 40%の収率で得ることができた。

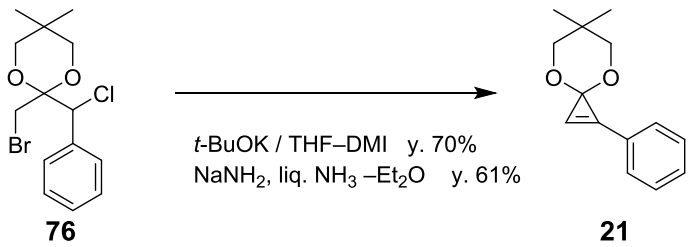
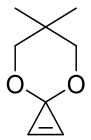
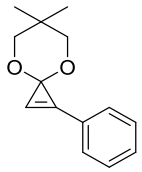
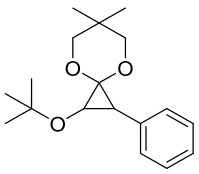


図 4.4 液体アンモニアの使用回避

3.　熱的に安定な重要中間体の検討

前項で述べた合成法により重要中間体 **21** を簡便に合成できるようになったが、その熱安定性を DSC で分析したところ、87 ℃で発熱開始し、発熱ピーク温度が 126 ℃であり、発熱量も 514 J / g であったため、大スケールでの単離、精製、乾燥工程での取り扱いには特別な配慮を要することが明らかとなった。また、フェニル置換基の無いシクロプロペノンアセタール **14** は 50 ℃以下で発熱を開始し、発熱ピーク温度が 136 ℃、発熱量は 752 J / g であり、**21** より熱安定性の点ではるかに劣っていた。

表 4. 2 DSC による安定性の比較

	融点	発熱開始温度	発熱ピーク温度	発熱量*
 **14**	室温以下	< 50 °C	136 °C	752 J / g
 **21**	54 °C	87 °C	126 °C	514 J / g
 **81**	75–76 °C	106 °C	138 °C	64 J / g

*一般に　< 100 J / g なら特別な配慮は不要

一方、上記の検討過程で単離されたシクロプロペノンアセタールの *t*-ブタノール付加体 **81** は発熱開始温度が 106 ℃、ピーク温度 138 ℃、発熱量 64 J / g と **14**、**21** と比較すると熱的に安定であることが明らかになった。さらに **81** はジハライド **76** に 2.5 当量の *t*-BuOK を THF 中室温にて反応させることにより良好な収率で合成される。以上の 2 点から **81** を

21 の前駆体として用いることを検討した。なお、*tert*-ブトキシ基は良い脱離基ではないものの、**81** に強塩基を作用させることによりシクロプロペノンアセタール **21** が生成するのではないかと考えた。

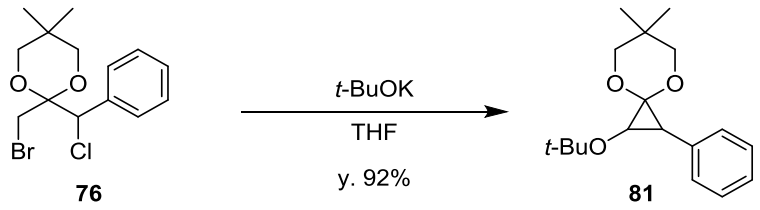


図 4. 5 *t*-ブタノール付加体 **81** の合成

t-ブタノール付加体 **81** に *n*-ブチルリチウムなどの強塩基を 1 当量作用させるとベンジル位の脱プロトン化に引き続いて *tert*-ブトキシ基の脱離が起こり、シクロプロペノンアセタール **21** が生成する。ただし、反応液中に副生成物としてリチウム *tert*-ブトキシドが存在するため、 図 4.6 に示す通り生成したアセタール **21** に付加して中間体 **83** へと戻る。この反応は平衡反応であり、水を添加し反応を停止させると、化合物 **81** と **21** の混合物が得られた。

系中にさらに 1 当量の強塩基を添加するとフェニル置換シクロプロペノンアセタールのリチウム試薬 **84** が生じ平衡が右側にシフトすると考えられる。そこで、*t*-ブタノール付加体 **81** に−60 ℃で 2 当量の *n*-ブチルリチウムを反応させた後、水を添加し反応を中止すると、予想通りシクロプロペノンアセタール **21** が得られた。脱プロトン化と脱離反応が遅いため反応が完結するには時間を要し、検討の結果、フェニル置換シクロプロペノンアセタールのリチウム試薬 **84** が完全に生じるには−60 ℃で 2 時間程度要することが明らかになった。なお、**84** は THF 中−50 ℃で分解するので、熱的に極めて不安定である。

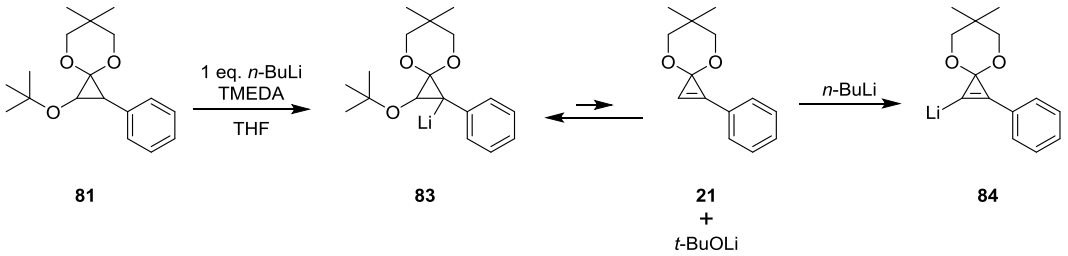


図 4.6 フェニル置換シクロプロペノンアセタールのリチウム試薬 **84** の生成

図 4.7 に示す通り、*t*-ブタノール付加体 **81** に−60 ℃で 2 当量の *n*-ブチルリチウムを反応させて得られる化合物 **21** の単離収率は 78%であった。この反応は、塩基としてトリエチルアミンや DBU を用いても進行しなかった。

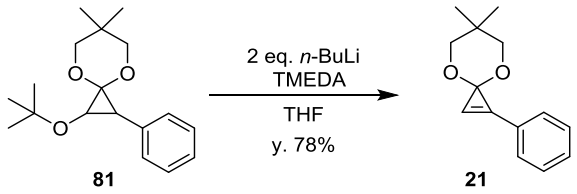
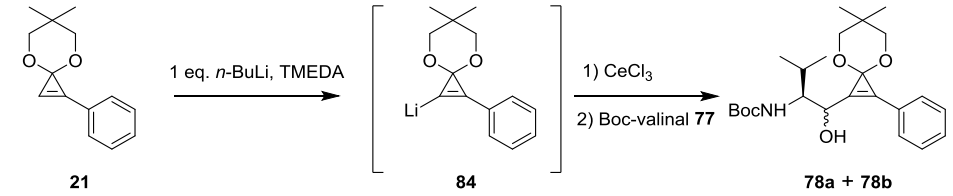


図 4.7 シクロプロペノンアセタール **21** の合成

以上の様に *t*-ブタノール付加体 **81** から **21** を良好な収率で合成することができ、さらに反応系中では対応するリチウム試薬 **84** が生成していると示唆する結果が得られた。これにより図 2.13 で示した最初の合成法、すなわち熱的に不安定な **21** からリチウム試薬を経由してセリウム試薬を生成させ、α-アミノアルデヒドと反応させる代わりに、*t*-ブタノール付加体 **81** から生成させたリチウム試薬をセリウム試薬へ金属交換し、α-アミノアルデヒドと反応させることができるのではないかと考えた（図 4.8)。



改良法

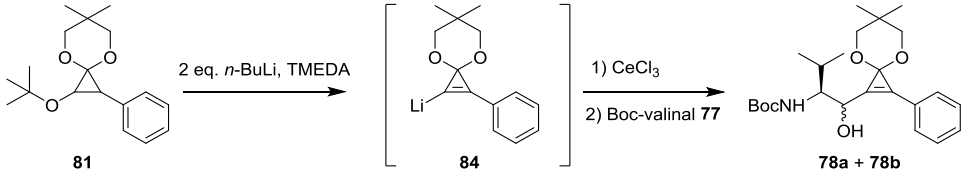


図 4. 8 鍵中間体 **78** のジアステレオ混合物の合成

そこで*t*-ブタノール付加体 **81** からフェニル置換シクロプロペノンアセタールのリチウム試薬 **84** を生成させた後、塩化セリウム 7 水和物を脱水して別途調製した無水塩化セリウムの THF 懸濁液 [78] を−60℃にて加えた。続けて、one-pot で(*S*)-Boc-バリナール（**77**）を加えた後、反応液を 3.5 時間室温で撹拌した。後処理後、カラムクロマトグラフィー精製すると単離収率 79%で鍵中間体 **78a**, **78b** の混合物を得ることができた。これは、熱的に不安定なシクロプロペノンアセタール **21** を出発物質として用いた場合（72%）より好収率であった。

4. 付加反応におけるジアステレオ選択性の検討

次にシクロプロペノンアセタールリチウム試薬 **84** の Boc-バリナール（**77**）への付加反応におけるジアステレオ選択性向上を目指し、アミノアルデヒドへの金属の配位によるキレーションコントロールについて検討した。図 4.9 に示す通りケトンのα位に配位性の官能基がありキレート可能な金属が介在するため、金属がアミノ基およびカルボニル酸素とキレートした配座が優先となり、求核剤がイソプロピル基との立体反発を避ける方向から近づき（キレーションモデル）、Felkin-Anh モデルとは立体選択性が逆になると考えられる。

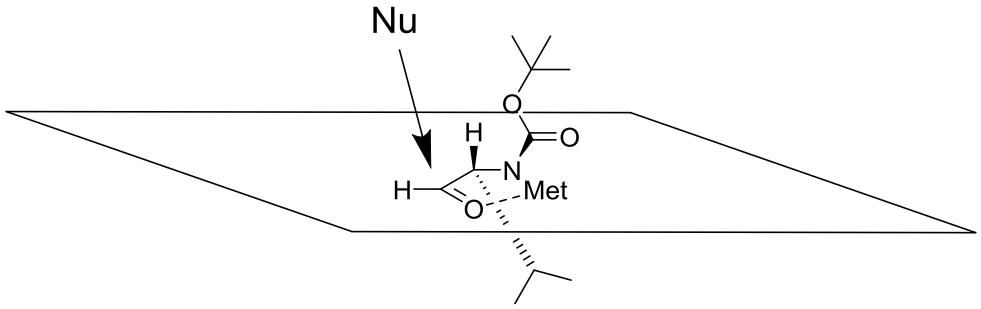
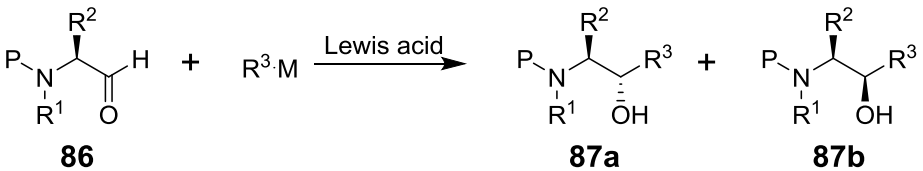


図 4.9 反応遷移状態におけるキレーションコントロールによる付加

α-アミノアルデヒドへの求核反応におけるジアステレオ選択性の検討では、これまで以下の報告がされている [96]。

α-アミノアルデヒドの保護基として Boc 基を用いた場合、立体化学的な安定性が低く選択性は 6 : 4 ~ 8 : 2 程度と高いジアステレオ選択性は望めないため [97]、出発物質として *N*, *N*-ジベンジル α-アミノアルデヒドを用いた検討がなされている [98]。この場合、用いるルイス酸の選択により目的とする立体化学のコントロールが可能となっている [99, 100]。また Cbz 基を保護基に用いた場合、ルイス酸として四塩化チタンを用い高い選択性（9 : 1）を得ている報告もある [101]。図 4.10 において保護基に Boc 基を用いた場合においても、図 4.11 に示すホモエノレート **85** を用いることにより 16 : 1 の選択性を得た報告もある [102]。その他、α-アミノアルデヒドに付加反応に先立ちルイス酸を作用させておくこと、保護基の変換により NH の酸性度を変える、高い反応温度によりキレーションコントロールの割合を高めることが検討されている [101–103]。



86 **87a** **87b**

P = Protective group; M = Metal

図 4.10 アミノアルデヒドへの付加反応

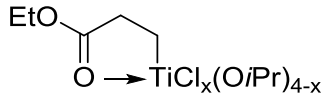
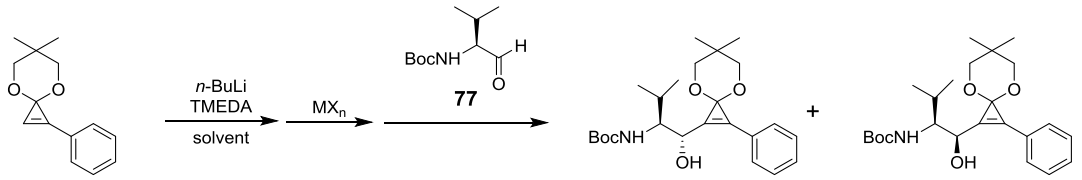


図 4.11 ホモエノラート **85**

そこで、表 4.3 に示す通り各種ルイス酸を検討した。まず溶媒を検討したところ、THF のほか、トルエンでも同様に進行した（entry 2）。セリウム試薬を用いた場合ジアステレオ選択性がリチウムより 10%程度向上し、収率も良好であった（entry 3）。一方、反応温度が−40 ℃以上では中間体が分解し目的物が得られなかった（entry 4）。その他の金属試薬を試したところ、マグネシウム試薬では選択性がリチウム試薬と同程度（entry 5）、亜鉛試薬では反応温度を上げても未反応で目的物は得られず（entry 6）、スズ試薬ではセリウム試薬と同程度の選択性であった（entry 7）。チタン試薬を用いたところ、セリウム試薬とほぼ同等の選択性および収率が得られた（entry 9）。

表 4.3 付加反応のジアステレオ選択性の検討（その 1）



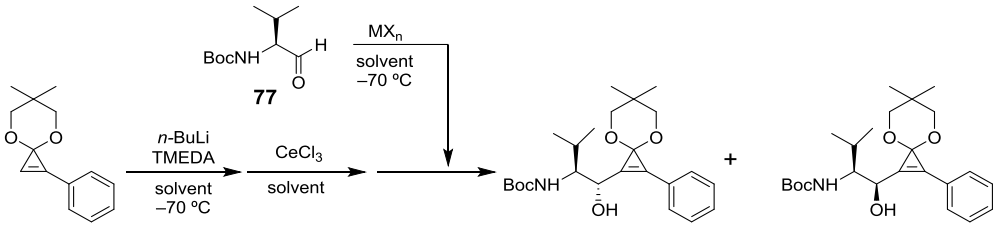
21 **78a** **78b**

entry	溶媒	MX_n	反応条件	単離収率, % from **77**	ジアステレオマー比 [a] **78a** : **78b**
1	THF	—	−70 °C, 3 hr	46	66 : 34
2	toluene	—	−70 °C, 3 hr	51	71 : 29
3	THF	$CeCl_3$	−70 °C, 3 hr	76	76 : 24
4	THF	$CeCl_3$	−40 °C, 1 hr	0	—
5	THF	$MgBr_2$	−70 °C, 3 hr	24	61 : 39
6	THF	$ZnBr_2$	−70 ~ 0 °C, 3 hr	0	—
7	toluene	$SnCl_4$	−40 °C, 3 hr	35	75 : 25
8	toluene	ClTi(O*i*-Pr)$_3$	−70 °C, 3 hr	37	73 : 27
9	toluene	Cl_2Ti(O*i*-Pr)$_2$	−70 °C, 3 hr	61	74 : 26
10	toluene	$TiCl_4$	−40 °C, 3 hr	49	70 : 30

[a] ^{1}H NMR または HPLC により決定

なお、表 4.4 に示す通り予めアルデヒド **77** の立体を金属の配位により固定化することも試みた。entry 5 に示す通りスズを配位させた場合、ジアステレオ選択性の向上が認められたものの収率が低く望ましい結果は得られなかった。

表 4. 4 付加反応のジアステレオ選択性の検討（その２）



entry	溶媒	MX_n	反応条件	単離収率, % from **77**	ジアステレオマー比 [a] **78a** : **78b**	備考
1	THF	—	−70 °C, 3 hr	76	76 : 24	
2	THF	$ZnCl_2$	−70 °C, 3 hr	67	75 : 25	
3	THF	$MgBr_2$	−70 °C, 3 hr	45	64 : 36	
4	toluene	$TiCl_4$	−40 °C, 3 hr	10	63 : 37	$CeCl_3$ 添加無し
5	toluene	$SnCl_4$	−70 °C, 3 hr	8	81 : 19	
6	THF	*n*-BuZnCl	−70 °C, 3 hr	26	67 : 33	

[a] ^{1}H NMR または HPLC により決定

5. NH 基の系中でのメタル化

化合物 **78a**, **78b** に示される 2-アミノ-1-アルカノール骨格は、アミノアルデヒド誘導体に求核試薬 **84** を反応させて得られる。図 4.12 に示す通り、Boc-バリナール（**77**）の保護された NH 基に結合した水素原子が求核剤 **84** と反応してしまうため、求核剤が 2 当量以上必要であった。

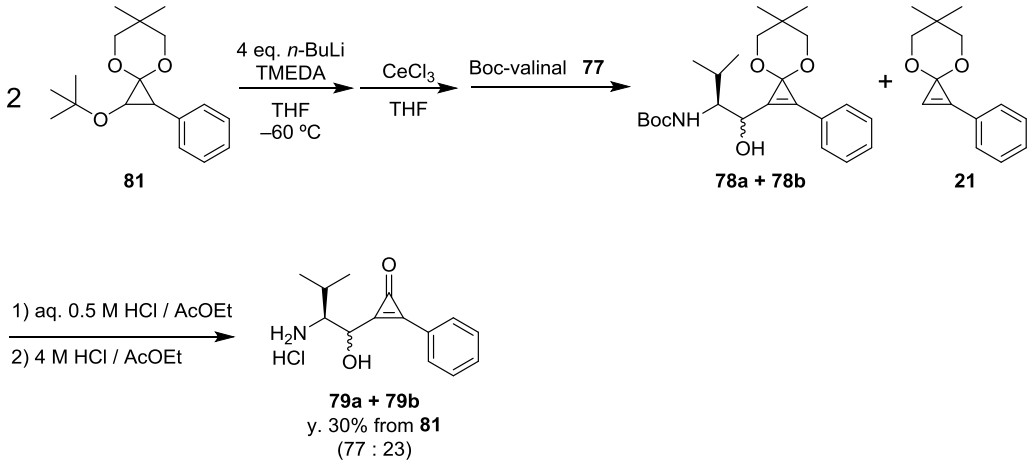
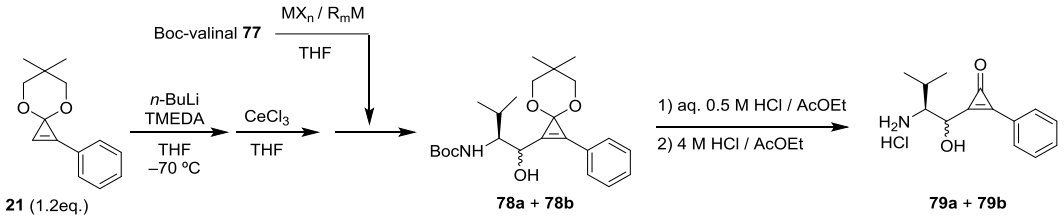


図 4.12 重要中間体 **81** の必要当量

これは 6 工程かけて合成した中間体 **81** を 2 当量用いることになるため製造上特にコストの観点から非常に不利である。そこで、NH 基を有機金属試薬により系中で金属アミドとして保護し、化合物 **81** の当量を低減することを検討した（表 4.5）。アルデヒド **77** の NH 基を炭素–亜鉛結合の分極が小さくアルデヒド類に対して不活性であるアルキル亜鉛により予め保護すると、1.2 当量の求核剤で良好な結果を得た（entries 3, 4）。なお、求核試薬として求核性の弱いセリウムアニオンを反応させると 1 当量で求核反応を行うことができるが、リチウムアニオンのようにより求核性の強い金属アニオンではエチル亜鉛との置換が起こるためか目的を達しえなかった（entry 6）。

表 4.5 NH 基の金属アミドでの保護



entry	MX_n / R_mM	単離収率 from **77**（%）	from **21**（%）	ジアステレオマー比 [a] **79a** : **79b**	備考
1	—	76	38	76 : 24	**21** を 2 eq.使用
2	$ZnCl_2$ + *n*-BuLi	42	35	79 : 21	
3	$ZnCl_2$ + 2*n*-BuLi	58	48	79 : 21	
4	Et_2Zn	65	54	78 : 22	
5	*t*-BuMgCl	50	42	77 : 23	
6	Et_2Zn	38	32	67 : 33	$CeCl_3$ 添加無し

[a] ^{1}H NMR、HPLC により決定

そこで図 4.13 に示す通り、安定な重要中間体 **81** を用い、アルデヒド **77** の NH 基をジエチル亜鉛により予め亜鉛アミドとして保護することにより、高価な求核剤の必要量を半減することができた。この一時的な保護により求核試薬に対する収率は 2 倍近く向上したが、操作がさらに煩雑になるため、実際の大量合成の際には採用しなかった。

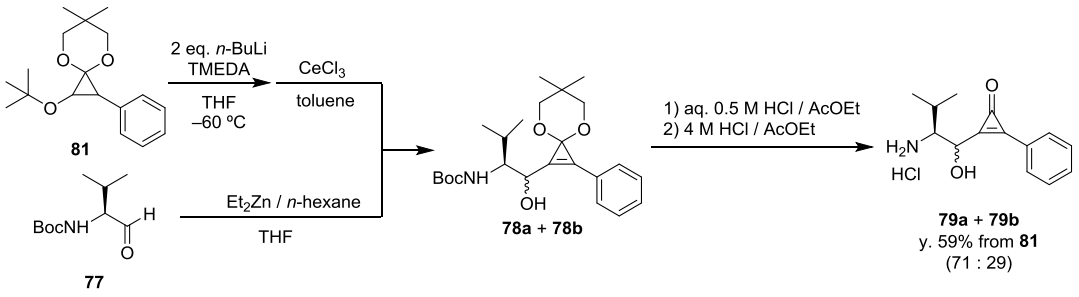


図 4.13 系中でのジエチル亜鉛による NH 基の保護

6.　塩化セリウムの調製方法

シクロプロペノンアニオン **84** の Boc-バリナール（**77**）への付加反応において、ジアステレオ選択性の向上（66 : 34　対 76 : 24）（本章第 4 項参照）およびアルデヒドのラセミ化を防ぐため、シクロプロペノンアセタール **21** を *n*-ブチルリチウムでリチオ化した後、無水塩化セリウムの THF 懸濁液を添加しセリウムに金属交換していた[78]。しかしながら、無水塩化セリウムを用いると、調製時・後処理のそれぞれの工程で操作が煩雑であった。すなわち、市販の 7 水和物から無水塩化セリウムの調製は真空ポンプで 1 mmHg に減圧下、140 ℃にて 6 時間加熱撹拌し行っていたが、高真空度での乾燥操作が煩雑であることに加え、完全に無水になっているかどうかの確認が困難であった。また、無水塩化セリウムの THF 懸濁液を−60 ~ 70 ℃に冷却し滴下する必要があり、さらに後処理段階では、反応終了後最初に濾過操作により固形物を除去する必要があった。そこで、無水塩化セリウムの調製方法および必要性について検討を行なった。

まず、7 水和物の脱水について詳細に検討したところ、図 4.14 に示す通り 3 水和物と 1 水和物が比較的安定に存在し、脱水は二段階で進行することが明らかになった。

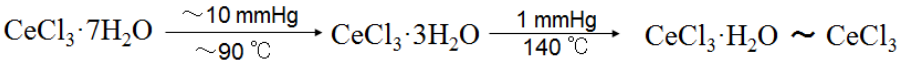
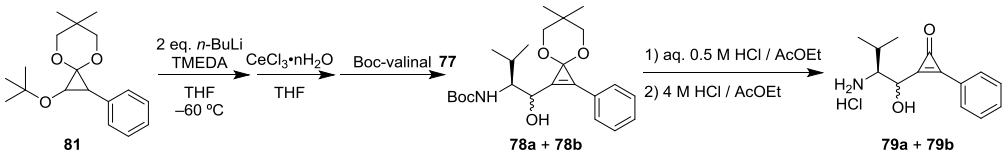


図 4. 14 無水塩化セリウムの調製

表 4.6 に示す通り 3 水和物を反応に用いたところ、結晶水により求核剤が全てプロトン化され目的物が得られなかったのに対し、1 水和物の状態では付加のジアステレオ選択性がやや下がるものの、付加体の収率が若干低い程度で無水反応に影響の無いことが判明した。塩化セリウム 1 水和物は水 1 分子がセリウムに強固に配位結合しているため、求核剤がプロトン化されることなくアルデヒドと反応したが、反応遷移状態においてセリウムにカルボニル酸素が十分配位できず、キレーションコントロールによる制御が十分に働かず選択性が低くなったと考えられる。

表 4.6 塩化セリウム水和物の検討



entry	$CeCl_3 \cdot nH_2O$	単離収率（%）	ジアステレオマー比 [a] **79a** : **79b**
1	$CeCl_3$	71	78 : 22
2	$CeCl_3 \cdot 3H_2O$	0	—
3	$CeCl_3 \cdot H_2O$	60	67 : 33

[a] ^{1}H NMR、HPLC により決定

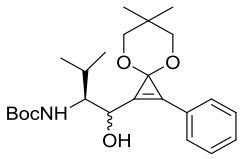
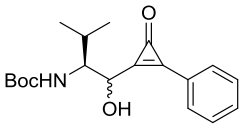
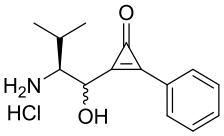
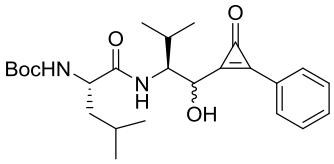
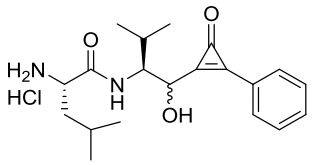
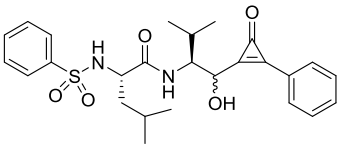
一方、Boc-バリナール（**77**）は立体障害のため塩基によるラセミ化が起こりにくいこと、リチウム試薬とセリウム試薬ではアニオンの安定性に変化が無い（−50 ℃で分解）ことが明らかになったため、ジアステレオ選択性が低下しても操作の簡便さを優先し、最終的には塩化セリウムを使わない方法に変更した。

7. 立体異性体の分離、精製

本章第 4 項で述べたとおり、付加反応工程の選択性は 7 : 3 ~ 8 : 2 であり、最終物に至るまでの工程で不要なジアステレオマーの分離を行う必要があった。小スケールの合成ではカラムクロマトグラフィーにて異性体を分離しており、BDA–410 を 600 g 製造した際には **57a** および **57b** の混合物 1.1 kg を分離精製するため、混合物 100 g をシリカゲル 5 kg にチャージして溶出溶媒を 100 L 用いたカラムクロマトを 11 回繰り返し実施した。その後、さらにスケールアップする必要が生じたため、カラムクロマトグラフィーによる精製の回避を検討した。

表 4.7 に示す通り、**78a, 78b** の混合物は若干不安定で分離しにくい、**88a, 88b** の混合物は分離しにくい、**79a, 79b** の混合物は高極性で吸湿性である、**58a**, **58b** の混合物は高極性である、**2a, 2b** の混合物は溶媒に難溶であることからそれぞれ異性体分離に適さないことから、**57a**,**57b** の混合物の段階で分離・精製することとした。

表 4.7 分離精製を行う化合物の検討

化合物	物性またはジアステレオマーの分離の可能性
 **78a** + **78b**	若干不安定で分離しにくい
 **88a** + **88b**	分離しにくい
 **79a** + **79b**	高極性、吸湿性
 **57a** + **57b**	可能性あり
 **58a** + **58b**	高極性
 **2a** + **2b**	溶媒に難溶

不要なジアステレオマー**57b** の溶解度が目的とする異性体 **57a** より低いことに注目し、両ジアステレオマーの各種溶媒に対する溶解度を網羅的に測定した。その結果、不要物 **57b**

を結晶として除去するには塩化メチレンが溶媒として最も効率的であったが、溶媒の毒性を考慮し酢酸エチルを選択し、図 4.15 に示す通りカラムクロマトグラフィーを回避した。

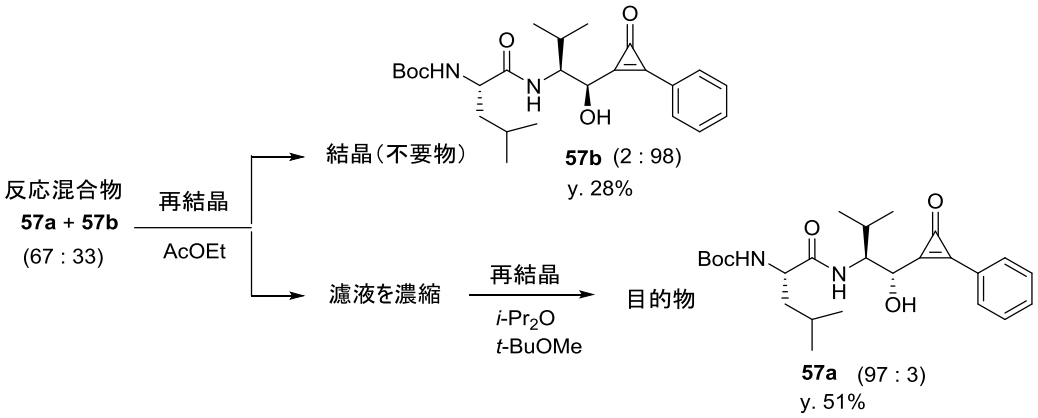


図 4.15 ジアステレオマーの分離

8. 研究部門での改良合成法

前項までに述べた検討結果に加え、出発物質であるジハライド **76** の合成ルートの検討、鍵中間体 **79a**, **79b** の単離工程の工夫について探索合成時の合成法（図 4.1）を改良し、蒸留・カラム精製の不要な合成法を確立した。

まず、ジハライド **76** の合成中間体であるフェニルアセトン **73** が覚せい剤原料（覚せい剤原料研究者、指定番号第 3604 号、神奈川県）であり、なおかつ蒸留精製工程が必要であったため、図 4.16 に示す通りフェニル酢酸クロリド **71** にメルドラム酸を反応させて化合物 **90** とし、これをワンポットで中間体 **73** を単離・精製すること無く化合物 **91** へ誘導する合成ルートを見出した。化合物 **91** は 2 当量のピリジニウムブロミドペルブロミドによりブロム化し出発物質 **92** へ導いた。

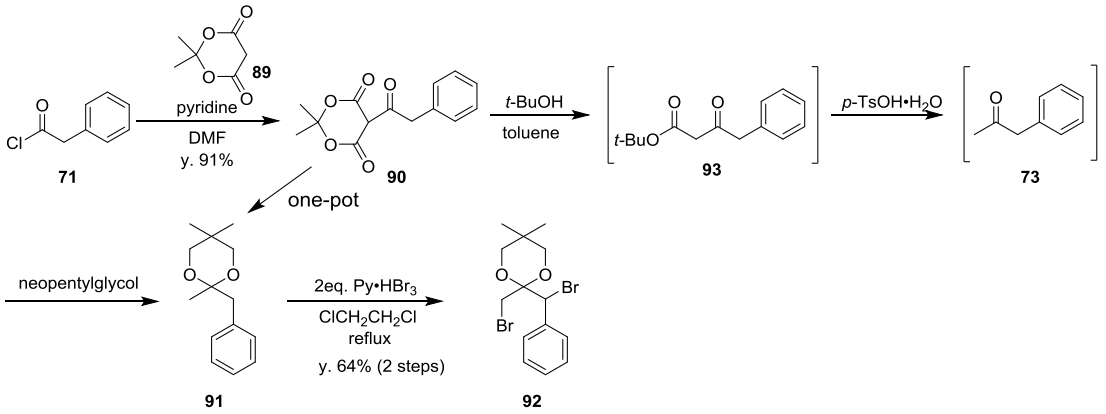
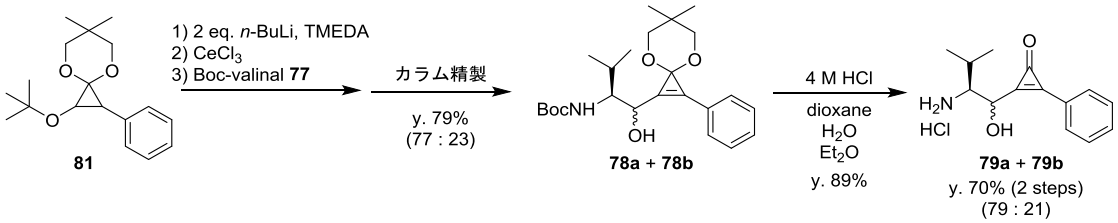


図 4.16 フェニルアセトン **73** を単離しない出発物質ジハライドの改良合成ルート

次に、これまで鍵中間体 **79a**, **79b** の混合物は、化合物 **78a**, **78b** の混合物をカラム精製した後アセタールを脱保護して得ていたが、図 4.17 に示す通り、反応終了後分液操作時に 0.5 M 塩酸水で洗うと、アセタールが脱保護された後不要なネオペンチルグリコールが水層に除去される。得られた粗な **88a**, **88b** の混合物の Boc 基を 4 M 塩酸で脱保護すると反応液からきれいな結晶が析出し、ろ過操作のみで高純度の目的物 **79a**, **79b** の混合物を得ることができた。



改良法

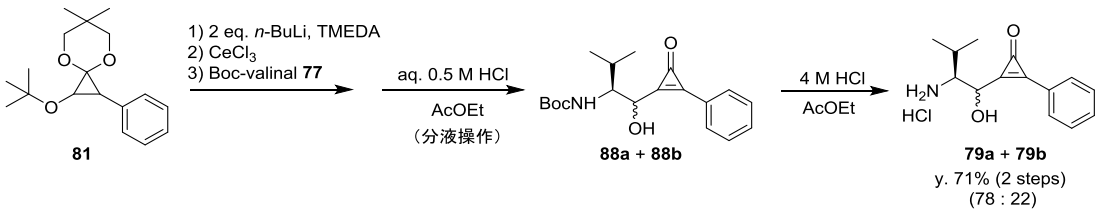


図 4.17 鍵中間体 **79** のジアステレオ混合物の単離工程の工夫

以上述べた研究部門での製法検討結果をまとめると図 4.18 のようになる。

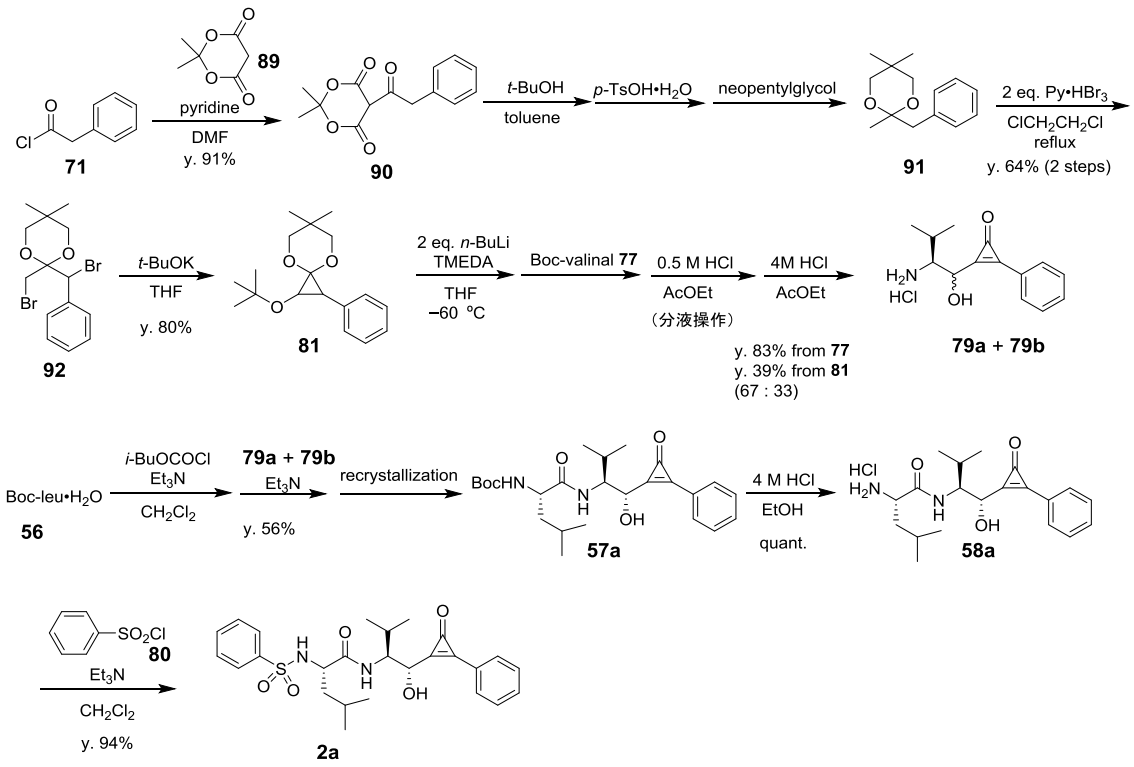


図 4.18 改良した合成法

9. （補足）前臨床試験用原薬の製造

前臨床試験用原薬の製造のためプロセス検討部門でさらに製法の検討が行われた。

本製造法を用いて外部委託で製造を行い、数十 kg の目的物 BDA–410 を得た。

10. まとめ

開発候補化合物 BDA–410 の大スケールでの合成法を検討した。

探索合成時の方法では、液体アンモニアを溶媒として用いていたこと、重要中間体であるシクロプロペノンアセタールが熱的に不安定であったこと、付加反応におけるジアステレオ選択性が十分でなかったこと、保護された NH のフリーの水素原子により重要中間体の求核剤が 1 当量以上必要であったこと、無水塩化セリウムの大スケールでの調製が困難であったこと、立体異性体の分離・精製にカラムクロマトグラフィーを用いていたこと等の課題があったため、これらを回避すべく製法検討を行い、改良した合成ルートを開発した。

総括

カルパインはアルツハイマー型認知症や脳卒中における神経細胞死などの疾病における神経細胞死の原因酵素としての関与が示唆されている。しかし、カルパインの阻害を標的とした研究開発が未だ発展途上にあり、その阻害薬は医薬品としては用いられていない。

一方、シクロプロペノン骨格は、安定なシクロプロペニウムカチオンの生成により水素結合の良い受容体になりうるのに加え、求核試薬の受容体としても働くユニークな化学的性質を有しており、これらの性質に基づき酵素の活性中心と相互作用することが期待される。しかし、生理活性を有するシクロプロペノン誘導体は、これまで天然物である penitricin などの極めて限られたものが報告されるのみであり、阻害薬として応用された例は皆無であった。

そこで、著者の研究所と現東京大学の中村らは、シクロプロペノン環により酵素阻害活性を発現する新規システインプロテアーゼ阻害薬の創薬研究を開始し、著者は本創薬研究において、新規システインプロテアーゼ阻害薬の設計と合成、および開発候補化合物の高次薬理試験および毒性試験用検体を供するための実用的合成法の開発を行った。

【新規システインプロテアーゼ阻害薬の設計と一般的合成法および構造最適化】

シクロプロペノン環は、カルボニル基がプロトン化されると、芳香族性を有する安定なシクロプロペニウムカチオンを生成する。従って、水素結合あるいは静電相互作用により酵素の触媒部位と相互作用することで、可逆的な酵素阻害薬となることが期待される。

一方、求電子試薬としての性質を用いると、システイン残基のチオール基と共有結合を形成することにより不可逆的な酵素阻害薬となることが期待される。そこで、既知のシステインプロテアーゼ阻害薬に含まれるペプチドユニットを、酵素に対する認識部位としてシクロプロペノン骨格に導入し新規システインプロテアーゼ阻害薬の設計を行った。

設計した化合物の合成は、リチオ化したシクロプロペノンアセタールを種々のα-アミノアルデヒド誘導体に付加させ、続く、アセタールの加水分解ともう一つのアミノ酸誘導体との縮合により行った。

構造最適化については、以下の通り行った。シクロプロペノン環上の置換基については、シクロプロペノン環の熱的な安定性を考慮し、フェニル置換基を導入した。ペプチドユニットについては、既知の阻害薬の部分構造を参考に、阻害活性やカルパインに対する選択性、さらに、α-アミノアルデヒド誘導体へのシクロプロペノンアセタールリチウム試薬の付加により生じる立体異性体の分離の観点より、ロイシン–バリンに最適化した。なお、付加反応により生じる立体異性体は、主生成物に由来する化合物の阻害活性が優れており、1′位の絶対立体化学は単結晶 X 線結晶構造解析により(*S*)と決定した。次に、末端アミノ基上の置換基について、アルコキシカルボニル基、アシル基、スルホニル基を検討した。その結果、ベンゼンスルホンアミド体に高い *in vitro* および *in vivo* 活性が見出された。さらに、水素結合形成等による *in vitro* 活性の向上や水溶解性付与等による *in vivo* 活性の向上を目的に、ベンゼンスルホニルアミドのベンゼン環上に種々の置換基やヘテロ原子を導入し検討したところ、無置換のベンゼンが最も良好な結果を与えた。以上の検討結果より、カルパイン選択的なシステインプロテアーゼ阻害薬の開発候補として BDA–410 を選択した。

BDA–410 は、システインプロテアーゼのうち、特にカルパインを選択的に阻害し、カテプシン B に対して選択性を有した。また、セリンプロテアーゼ（トロンビン・カテプシン G)、アスパラギン酸プロテアーゼ（カテプシン D）の阻害活性は弱かった。m-カルパインに対する阻害様式の検討を行ったところ、拮抗的な可逆的阻害であることが分かった。

なお、BDA–410 については、別途行なわれたアルツハイマー型認知症等の種々の動物モデルで良好な薬理作用を示し、さらに、一般毒性、催奇形性、癌原性予測において安全性上の問題は見出されていない。

【開発候補化合物の実用的合成法の開発】

次に著者は、高次薬効試験および毒性試験を実施するため、開発候補化合物である BDA–410 のキログラムスケールでの合成法の開発に着手した。探索研究当初の合成法では、液体アンモニア溶媒の使用、熱的に不安定なシクロプロペノンアセタール中間体の経由、α-アミノアルデヒド誘導体へのシクロプロペノンアセタールリチウム試薬の付加のジアステレオ選択性、カラムクロマトグラフィーによる精製工程等に課題があったため、これらを改善・回避する実用的な合成法が必要であった。

まず、ジハロアセタールの環化反応によるシクロプロペノンアセタール中間体の合成で用いていた、液体アンモニア溶媒とナトリウムアミドを回避する簡便な合成法を開発した。検討の結果、THF と DMI の混合溶媒中、2.2 当量の *t*-BuOK をジハロアセタールに作用させることにより 70%の収率で目的のシクロプロペノンアセタール中間体を得た。本合成法により、誘導体合成は簡便になったが、シクロプロペノンアセタール中間体の熱安定性を DSC で分析したところ、87 ℃以上で 514 J / g の発熱量を伴い分解した、一般にキログラムスケールを超えるような大スケールでの取り扱いに特別な配慮を要する 100 J / g を大きく超えていたことから、シクロプロペノンアセタール中間体の使用は避けるべきであると判断した。一方、シクロプロペノンアセタール中間体の合成検討の過程で単離された *t*-ブタノール付加体は発熱量が 64 J / g と熱的に安定であり、かつ、合成も容易であった。そこで、*t*-ブタノール付加体をシクロプロペノンアセタール中間体の前駆体として用いることを検討した。その結果、*t*-ブタノール付加体を *n*-BuLi で処理して系中で生成させたシクロプロペノンアセタールのリチウム試薬にワンポットで Boc-バリナールを加えたところ、シクロプロペノンアセタールから直接金属試薬を生成させて反応を行った際と同等の収率で付加体を得ることに成功した。

次に、シクロプロペノンアセタール金属試薬の Boc-バリナールへの付加反応におけるジアステレオ選択性の検討を行った。シクロプロペノンアセタール中間体のリチウム試薬に、塩化セリウムおよびチタン化合物を加えて、それぞれセリウム試薬およびチタン試薬に変

換して反応を行ったところ、ジアステレオ選択性に関して良好な結果が得られた。また、Boc-バリナールの NH 基により求核剤が 2 当量以上必要であったが、NH 基をジエチル亜鉛により前もって系中で亜鉛アミドとし、高価な求核剤の必要量を半減させることができた。なお、反応に添加した無水のセリウム塩は、当初、市販の 7 水和物から無水物を調製した後に使用していたが、大量スケールでの脱水操作が困難であったため、調製方法とその必要性に関して検討したところ、1 水和物を用いても反応には影響せず、また、Boc-バリナールは立体障害によりラセミ化しにくいことがわかった。

最後にカラムクロマトグラフィーを回避するための検討を行なった。小スケールの合成では付加反応で生成したジアステレオマーに由来する不要な異性体をカラムクロマトグラフィーを用いて除去していた。ここで、不要なジアステレオマーの溶解度が、目的物より低いことに着目し、両ジアステレオマーの各種溶媒に対する溶解度を網羅的に測定した。その結果、酢酸エチルを用いれば再結晶操作により、カラムクロマトグラフィーを行わずに、目的物のみが得られることがわかった。

以上の検討により、熱的に不安定な中間体の経由とカラムクロマトグラフィーによる分離・精製等を回避した、実用的な合成法を開発した（図 4.18）。

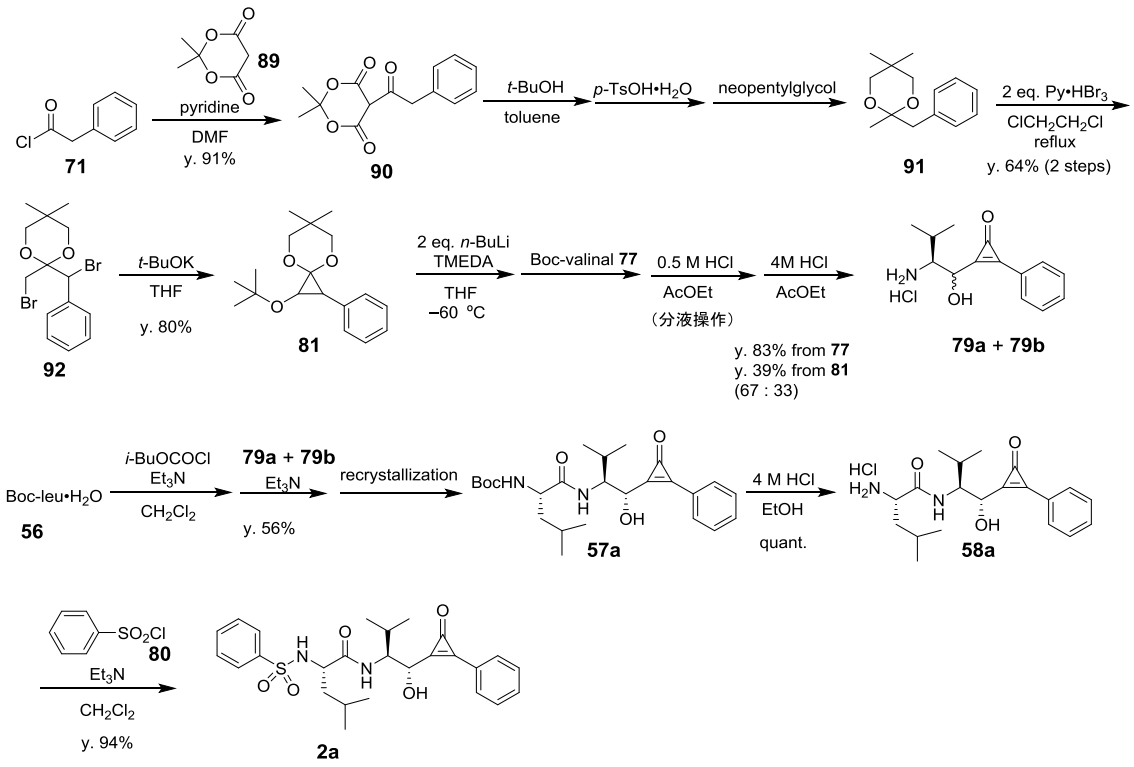


図 4.18 改良した合成法（再掲）

なお、その実用性は、プロセス検討部門で、実際に本合成法に基づき、数十 kg の原薬が製造されたことから実証された。

実験の部

1. Experimental section for Chapter II

General

All ^{1}H NMR spectra taken at 250 MHz were measured on a Bruker AC-250 instrument, and are reported in parts per million (ppm) from internal tetramethylsilane. All ^{13}C NMR spectra taken at 75 MHz were measured on a Bruker ARX-300 instrument and are reported in parts per million. IR spectra were recorded on a JASCO FT / IR-5300 instrument; absorptions are reported in cm^{-1}. Fluorescence for enzyme inhibition assays was recorded on a Hitachi Fluorescence Spectrophotometer F-3000. Most of reagents were purchased from Tokyo Chemical Industry, and used without further purification. Thermal stability of compounds was evaluated by a Seiko DSC-20 instrument. For each compound, a 1 mg of sample was placed in a sealed Ag pressure-resistant cell under nitrogen. The sample was then heated from room temperature to 450 °C at a rate of 10 °C / min. Single-crystal X-ray was measured by ENRAF-Nonius CAD4.

General procedure for **32a** and **32b** in **figure 2.14** (R^1 = isopropyl; R^2 = Ph)

2-((*2S*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (78a and 78b) (in **figure 4.1**)

2-Phenylcyclopropenone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (**21**)[37, 40] (3.51 g, 16.3 mmol) was dissolved in THF (30 mL), and TMEDA (3.8 g, 33 mmol) was added. Then the resulting solution was cooled to −70 °C, and *n*-BuLi (1.55 M solution in *n*-hexane, 10.5 mL, 16.3 mmol) was added. After stirring for 20 minutes at that temperature, a cooled suspension of anhydrous $CeCl_3$, which was prepared from $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ (8.0 g, 22 mmol) by drying *in vacuo* at 140 °C for 2 hours, in THF (30 mL) was added, and the resulting suspension was stirred for 20 minutes. Next (*S*)-*N*-*tert*-butoxycarbonylvalinal (**77**) (1.82 g, 9.05 mmol) in THF (20 mL) was added, and the resulting suspension was stirred at −70 °C for 2 hours. The reaction mixture was quenched by the

addition of water (1 mL) in THF (5 mL) at −70 °C, and the temperature of it was raised to 20 °C. Then the resulting suspension was filtered by a pad of Celite and washed three times with ethyl acetate. After the filtrate was dried over Na_2SO_4, the solvent was evaporated to afford a crude mixture, which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 4 : 1) to give a mixture of **78a** and **78b** in 75 : 25 ratio (2.71 g, 6.50 mmol, 72%). IR (KBr, a mixture of **78a** and **78b**) 3430, 2960, 1855, 1800, 1710, 1690 cm^{-1}; ^1H NMR (CD_3OD, a mixture of **78a** and **78b**) δ 0.95–1.60 (m, 12H), 1.38 (s, 3H), 1.42 (s, 6H), 1.95–2,15 (m, 1H), 3.60–3.75 (m, 1H), 3.75–3.95 (m, 4H), 5.00–5.10 (m, 1H), 6.03 (d, *J* = 10 Hz, 0.33H), 6.23 (d, *J* = 10 Hz, 0.67H), 7.40–7.65 (m, 3H), 7.70–7.90 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{24}H_{35}NO_5$, a mixture of **78a** and **78b**: C, 68.59; H, 8.89; N, 3.28. Found: C, 68.20; H, 8.77; N, 3.24.

2-((2*S*)-2-Amino-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (79a and 79b)

To a solution of the mixture of the above acetal **78a** and **78b** in 75 : 25 ratio (3.12 g, 7.48 mmol) in 1,4-dioxane (8 mL) and water (0.2 mL), 4 M HCl in 1,4-dioxane (24 mL) was added at room temperature. After stirring for 20 minutes, the formed precipitates were filtered and washed with 1,4-dioxane to afford a mixture of **79a** and **79b** in 75 : 25 ratio (1.87 g, 6.99 mmol, 94%) as a highly hygroscopic solid. IR (KBr, a mixture of **79a** and **79b**) 3200, 1855, 1618 cm^{-1}; ^1H NMR (CD_3OD, a mixture of **79a** and **79b**) δ 1.20 (d, *J* = 7.0 Hz, 2.25H), 1.22 (d, *J* = 7.0 Hz, 2.25H), 1.23 (d, *J* = 6.0 Hz, 0.75H), 1.25 (d, *J* = 6.0 Hz, 0.75H), 2.10 (m, 0.25H), 2.30 (m, 0.75H), 3.38 (dd, *J* = 6.0 Hz, 6.0 Hz, 0.25H), 3.45 (dd, *J* = 6.0 Hz, 6.0 Hz, 0.75H), 5.21 (d, *J* = 6.0 Hz, 0.75H), 5.45 (d, *J* = 6.0 Hz, 0.25H), 7.60–7.80(m, 3H), 8.10–8.20 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{14}H_{17}NO_2$•1.1HCl•0.6H_2O, a mixture of **79a** and **79b**: C, 59.97; H, 6.92; N, 5.00; Cl, 13.28. Found: C, 60.00; H, 6.66; N, 5.20; Cl, 13.35.

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone (38a) and 2-((1*R*,2*S*)-2-((*S*)-2-cyclohexylmethoxy carbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone (38b)

To a solution of (*S*)-*N*-cyclohexylmethoxycarbonylleucine **31** (2.46 g, 8.79 mmol) in CH_2Cl_2 (40 mL), were added triethylamine (0.92 g, 9.1 mmol) and isobutyl chloroformate (1.15 g, 8.73 mmol) at −5 °C, and the resulting solution was stirred at that temperature for 15 minutes. Then a mixture of **79a** and **79b** in 75 : 25 ratio (1.87 g, 6.99 mmol) and triethylamine (0.97 g, 9.6 mmol) were added and the resulting solution was stirred for an hour. After adding 0.5 M HCl solution (10 mL), the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2. The combined extracts were washed successively with water, saturated $NaHCO_3$ solution, and saturated NaCl solution, and dried over $MgSO_4$. Removal of the solvent gave a crude solid, which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 1 : 1) to give **38a** (1.86 g, 3.84 mmol, 55%) and **38b** (0.61 g, 1.3 mmol, 18%).

38a: mp 85–89 °C; IR (KBr) 3330, 1858, 1695, 1658, 1625 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.77 (d, *J* = 5.0 Hz, 6H), 0.80–1.05 (m, 2H), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.10 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.10–1.80 (m, 12H), 2.40 (m, 1H), 3.50–3.88 (m, 3H), 4.09 (m, 1H), 5.11 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 5.31 (m,1H), 7.36–7.62 (m, 4H), 7.98 (dd, *J* = 7.5 Hz, 1.7 Hz, 2H). Anal. Calcd for $C_{28}H_{40}N_2O_5 \cdot H_2O$: C, 66.91; H, 8.42; N, 5.57. Found: C, 66.96; H, 8.14; N, 5.46.

38b: mp 148–149 °C; IR (KBr) 3350, 3260, 1860, 1825, 1715, 1653, 1625 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.80–1.00 (m, 8H), 1.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.15 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.10–1.80 (m, 12H), 2.16 (m, 1H), 3.68 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 4.02–4.22 (m, 2H), 5.14 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.19 (d, *J* = 6.5 Hz, 1H), 6.92 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.42–7.65 (m, 3H), 7.99 (dd, *J* = 6.7 Hz, 1.5 Hz, 2H). Anal. Calcd for $C_{28}H_{40}N_2O_5 \cdot 0.2H_2O$: C, 68.88; H, 8.34; N, 5.74. Found: C, 68.85; H, 8.55; N, 5.67.

2-((2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)cyclopropenone (33a and 33b) (a mixture in 7 : 3 ratio)

IR (KBr, a mixture of **33a** and **33b**) 3310, 1825, 1690, 1650 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, a mixture of **33a** and **33b**) δ 0.80–1.80 (m, 26H), 1.90–2.35 (m, 2H), 3.60–4.25 (m, 4H), 4.87–5.05 (m, 1H), 5.05–5.45 (m, 1H), 6.85–7.03 (m, 0.3H), 7.35–7.52 (m, 0.7H), 8.54 (s, 0.7H), 8.62 (s, 0.3H). Anal. Calcd for $C_{22}H_{36}N_2O_5 \cdot 0.7H_2O$, a mixture of **33a** and **33b**: C, 62.74; H, 8.95; N, 6.65. Found: C, 62.72; H, 8.81; N, 6.50.

2-((2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxyhexyl) cyclopropenone (34a and 34b) (a mixture in 8 : 2 ratio)

IR (KBr, a mixture of **34a** and **34b**) 3340, 1830, 1690, 1650 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, a mixture of **34a** and **34b**) δ 0.80–1.05 (m, 11H), 1.10–1.88 (m, 18H), 2.24 (s, 1H), 3.73–3.95 (m, 2H), 4.05–4.30 (m, 2H), 4.80–4.93 (m, 1H), 5.20–5.35 (m, 0.2H), 5.35–5.55 (m, 0.8H), 5.55–5.75 (m, 0.8H), 6.95–7.05 (m, 0.2H), 8.57 (s, 0.8H), 8.68 (s, 0.2H). Anal. Calcd for $C_{23}H_{38}N_2O_5$, a mixture of **34a** and **34b**: C, 65.38; H, 9.06; N, 6.63. Found: C, 65.37; H, 9.28; N, 6.51.

2-((2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxyhexyl)-3-methylcyclopropenone (35a and 35b) (a mixture in 6 : 4 ratio)

IR (KBr, a mixture of **35a** and **35b**) 3320, 1845, 1690, 1653, 1630 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, a mixture of **35a** and **35b**) δ 0.85–1.10 (m, 11H), 1.10–1.95 (m, 18H), 2.33 (s, 3H), 2.49 (s, 1H), 3.75–3.97 (m, 2H), 3.97–4.28 (m, 2H), 4.73–4.90 (m, 1H), 5.20–5.85 (m, 1.6H), 7.10–7.50 (m, 0.4H). Anal. Calcd for $C_{24}H_{40}N_2O_5 \cdot 0.3H_2O$, a mixture of **35a** and **35b**: C, 65.22; H, 9.26; N, 6.34. Found: C, 65.14; H, 9.26; N, 6.07.

2-((2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxyhexyl)-3-isopentylcyclopropenone (36a and 36b) (a mixture in 6 : 4 ratio)

IR (KBr, a mixture of **36a** and **36b**) 3310, 1838, 1720, 1698, 1652, 1620 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, a mixture of **36a** and **36b**) δ 0.85–1.10 (m, 21H), 1.10–1.95 (m, 21H), 2.45–2.55 (m, 1H), 2.55–2.70 (m, 2H), 3.73–3.93 (m, 2H), 3.93–4.25 (m, 2H), 4.73–4.85 (m, 1H), 5.25–5.85 (m, 1.6H), 7.30–7.45 (m, 0.4H). Anal. Calcd for $C_{28}H_{48}N_2O_5 \cdot 0.5H_2O$, a mixture of **36a** and **36b**: C, 67.03; H, 9.84; N, 5.58. Found: C, 67.26; H, 9.81; N, 5.28.

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxyhexyl)-3-((*Z*)-1-hexenyl) cyclopropenone (37a)

mp 138–140 °C; IR (KBr) 3290, 1838, 1711, 1655, 1630 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.83–1.08 (m, 14H), 1.10–2.05 (m, 22H), 2.56 (m, 2H), 3.85 (s, 2H), 4.02 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 4.82 (m, 1H), 5.22–5.48 (m, 2H), 6.26 (d, J = 10 Hz, 1H), 6.48 (m, 1H), 7.08 (m, 1H). Anal. Calcd for $C_{29}H_{42}N_2O_5 \cdot 0.2H_2O$: C, 69.35; H, 8.51; N, 5.58. Found: C, 69.33; H, 8.56; N, 5.49.

2-((2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxyhexyl)-3-phenylcyclopropenone (39a and 39b) (a mixture in 7 : 3 ratio)

IR (KBr, a mixture of **39a** and **39b**) 3310, 1855, 1690, 1655, 1625 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, a mixture of **39a** and **39b**) δ 0.65–0.75 (m, 1.2H), 0.75–1.05 (m, 7.8H), 1.10–2.00 (m, 20H), 2.07 (s, 1H), 3.65–3.90 (m, 2H), 4.00–4.20 (m, 1.7H), 4.20–4.35 (m, 0.3H), 4.95–5.05 (m, 1H), 5.10–5.30 (m, 0.3H), 5.45–5.60 (m, 0.7H), 5.70–5.85 (m, 1H), 7.00–7.25 (m, 0.7H), 7.45–7.56 (m, 3.3H), 7.95–8.05 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{29}H_{42}N_2O_5 \cdot 0.2H_2O$, a mixture of **39a** and **39b**: C, 69.35; H, 8.51; N, 5.58. Found: C, 69.45; H, 8.45; N, 5.38.

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-(4-fluorophenyl)cyclopropenone (40a)

mp 86–90 °C; IR (KBr) 3320, 1858, 1693, 1656, 1625, 1602 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.79 (d, *J* = 5.9 Hz, 6H), 1.01 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.70–1.45 (m, 7H), 1.45–1.83 (m, 7H), 2.39 (m, 1H), 3.50–3.85 (m, 3H), 4.08 (m, 1H), 5.10 (dd, *J* = 8.6 Hz, 4.7 Hz, 1H), 5.25 (m, 1H), 6.23 (m, 1H), 7.19 (dd, *J* = 8.5 Hz, 8.5 Hz, 2H), 7.47 (m, 1H), 8.01 (dd, *J* = 8.5 Hz, 5.5 Hz, 2H). Anal. Calcd for $C_{28}H_{39}FN_2O_5 \cdot 0.4H_2O$: C, 65.96; H, 7.87; N, 5.49. Found: C, 65.88; H, 7.99; N, 5.67.

2-((1*R*,2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-(4-fluorophenyl)cyclopropenone (40b)

mp 166–168 °C; IR (KBr) 3340, 3260, 1861, 1714, 1655, 1625 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.63–1.03 (m, 8H), 1.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.03–1.80 (m, 12H), 2.14 (m, 1H), 3.55–3.85 (m, 2H), 3.95–4.15 (m, 2H), 5.00–5.23 (m, 2H), 5.29 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 6.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.18 (dd, *J* = 8.5 Hz, 8.5 Hz, 2H), 8.04 (dd, *J* = 8.5 Hz, 5.8 Hz, 2H). Anal. Calcd for $C_{28}H_{39}FN_2O_5 \cdot H_2O$: C, 64.60; H, 7.94; N, 5.38. Found: C, 64.38; H, 7.63; N, 5.35.

2-((2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxyhexyl)-3-(1-methylphenyl)cyclopropenone (41a and 41b) (a mixture in 7 : 3 ratio)

IR (KBr, a mixture of **41a** and **41b**) 3320, 1845, 1692, 1655, 1615 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, a mixture of **41a** and **41b**) δ 0.60–1.05 (m, 11H), 1.05–2.00 (m, 18H), 2.66 (s, 2.1H), 2.68 (s, 0.9H), 3.65–3.95(m, 2H), 3.95–4.35 (m, 2H), 4.95–5.12 (m, 1H), 5.24 (m, 0.3H), 5.55 (m, 0.7H), 7.05–7.35 (m, 6H), 7.35–7.50 (m, 3H), 8.05–8.20 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{30}H_{44}N_2O_5 \cdot 0.2H_2O$, a mixture of **41a** and **41b**: C, 69.79; H, 8.67; N, 5.43. Found: C, 69.96; H, 9.09; N, 5.20.

2-((2*S*)-2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxyhexyl)-3-(5-trimethylsilyl-2-thienyl)cyclopropenone (42a and 42b) (a mixture in 7 : 3 ratio)

IR (KBr, a mixture of **42a** and **42b**) 3320, 1853, 1655, 1615 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$, a mixture of **42a** and **42b**) δ 0.35 (s, 9H), 0.70–1.05 (m, 11H), 1.10–2.00 (m, 18H), 3.73–3.90 (m, 2H), 3.99–4.15 (m, 2H), 4.92 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H), 4.95–5.10 (m, 0.3H), 5.10–5.30 (m, 0.7H), 6.50–6.65 (m, 0.3H), 6.80–6.95 (m, 0.7H), 7.29 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 3.6 Hz, 0.7H), 7.84 (d, *J* = 3.6 Hz, 0.3H). Anal. Calcd for $C_{30}H_{48}N_2O_5SSi•0.3H_2O$, a mixture of **42a** and **42b**: C, 61.88; H, 8.41; N, 4.81. Found: C, 61.62; H, 8.43; N, 4.72.

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-Benzyloxycarbonylaminopropionylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone (44a)

mp 156–158 °C; IR (KBr) 3290, 1850, 1690, 1643, 1618 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.98 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H), 1.07 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.19 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 2.36 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 4.18 (m, 1H), 4.90–5.15 (m, 3H), 5.47 (m, 1H), 7.31 (s, 5H), 7.25–7.65 (m, 5H), 7.95 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H). Anal. Calcd for $C_{25}H_{28}N_2O_5•0.5H_2O$: C, 67.40; H, 6.56; N, 6.29. Found: C, 67.49; H, 6.48; N, 6.24.

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-Benzyloxycarbonylamino-3-methylbutyrylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone (45a)

mp 157–158 °C; IR (KBr) 3310, 1850, 1697, 1643, 1618 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.74 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.04 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 4.01 (m, 1H), 4.90–5.10 (m, 3H), 5.47 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 6.15 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.30 (s, 5H), 7.40–7.60 (m, 4H), 7.93–8.00 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{27}H_{32}N_2O_5•0.2H_2O$: C, 69.27; H, 6.98; N, 5.98. Found: C, 69.39; H, 7.09; N, 5.96.

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-Benzyloxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone (46a)

mp 84–94 °C; IR (KBr) 3320, 1855, 1700, 1655, 1625 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.60–0.85 (m, 6H), 0.97 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.07 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.20–1.60 (m, 3H), 1.85–2.25 (m, 1H), 2.25–2.45 (m, 1H), 3.55–3.70 (m, 1H), 4.00–4.10 (m, 1H), 4.85–5.15 (m, 3H), 5.53 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.29 (s, 5H), 7.40–7.60 (m, 4H), 7.93–8.05 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{28}H_{34}N_2O_5$•$0.3H_2O$: C, 69.49; H, 7.21; N, 5.79. Found: C, 69.41; H, 7.30; N, 5.66.

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-Benzyloxycarbonylamino-3-phenylpropionylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone (47a)

mp 175–177 °C; IR (KBr) 3300, 1850, 1697, 1648, 1620 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.85 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.95 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 2.28 (m, 1H), 2.80 (dd, *J* = 14 Hz, 7.9 Hz, 1H), 2.99 (dd, *J* = 14 Hz, 7.9 Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 4.42 (m, 1H), 4.85–5.05 (m, 3H), 5.42 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 5.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.05–7.35 (m, 10H), 7.35–7.60 (m, 4H), 7.92–8.03 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{31}H_{32}N_2O_5$: C, 72.64; H, 6.29; N, 5.46. Found: C, 72.78; H, 6.37; N, 5.46.

2-(2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-2-methylpropyl)-3-phenylcyclopropenone (**48a** and **48b**) was synthesized as follows;

2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-1-propanol (51)

To a solution of 2-amino-2-methyl-1-propanol (**50**) (4.45 g. 50 mmol) and di-*tert*-butyl dicarbonate (10.9 g, 50 mmol) in THF (100 mL), triethylamine (505 mg, 5.0 mmol) was added. The resulting solution was stirred at room temperature overnight, and diluted hydrochloric acid (100 mL) was added. After extraction with ethyl acetate, the combined extracts were washed with saturated NaCl solution, and dried over $MgSO_4$. Removal of the solvent gave a crude product (9.67 g, 51.2 mmol, 102%), which was used without purification. ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 1.27 (s, 6H), 1.43 (s, 9H), 3.58

(s, 2H), 4.67 (s, 1H).

2-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-methyl-1-propanal (52)

The crude 2-*tert*-butoxycarbonylamino-2-methyl-1-propanol (**51**) (2.84 g, 15 mmol) was dissolved in DMSO (50 mL), and triethylamine (7.59 g, 75 mmol) was added. Then, pyridine-sulfur trioxide complex (11.9 g, 75 mmol) in DMSO (50 mL) was added for 5 minutes. After stirring for 30 minutes at room temperature, water (800 mL) was added, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate. Combined extracts were washed successively with 10% citric acid solution, saturated NaCl solution, saturated $NaHCO_3$ solution, and saturated NaCl solution, and dried over $MgSO_4$. Removal of the drying agent and concentration afforded a crude product, which was purified by flush column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 4 : 1) to afford a solid (1.57 g). *n*-Hexane (10 mL) was added to the solid, and the resulting precipitates were filtered and the filtrate was washed with *n*-hexane to afford the titled compound (1.25 g, 6.68 mmol, 45%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.33 (s, 6H), 1.44 (s, 9H), 5.00 (s, 1H), 9.43 (s, 1H).

2-(2-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-hydroxy-2-methylpropyl)-3-phenylcyclopropenone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (53)

2-Phenylcyclopropenone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (**21**) (2.27 g, 10.5 mmol) was dissolved in THF (40 mL), and TMEDA (3.08 g, 26.5 mmol) was added. Then the resulting solution was cooled to −78 °C, and *n*-BuLi (1.58 M solution in *n*-hexane, 8.4 mL, 13.3 mmol) was added. After stirring for 15 minutes at that temperature, 2-*tert*-butoxycarbonylamino-2-methyl-1-propanal (**52**) (1.24 g, 6.64 mmol) in THF (10 mL) was added, and the resulting solution was stirred at −70 °C for 15 minutes. The reaction mixture was quenched by the addition of water (1mL) in THF (5 mL) at −70 °C, and the temperature of it was raised to 20 °C. Then Na_2SO_4 (10 g) was added, and the resulting suspension was filtered and washed with ethyl acetate. The filtrate was evaporated to

afford a crude mixture, which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 9 : 1 to 5 : 1) to give the titled compound (1.70 g, 4.22 mmol, 64%). IR (KBr) 3300, 1800, 1675, 1562 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.94 (s, 3H), 1.25 (s, 3H), 1.27 (s, 9H), 1.41 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 3.76 (m, 2H), 3.86 (m, 2H), 4.78 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 5.60 (s, 1H), 7.30–7.45 (m, 3H), 7.70–7.95 (m, H).

2-(2-Amino-1-hydroxy-2-methylpropyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (54)

To a solution of 2-(2-*tert*-butoxycarbonylamino-1-hydroxy-2-methylpropyl)-3-phenylcyclopropenone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (**53**) (1.69 g, 4.19 mmol) in diethyl ether (5 mL), 4 M HCl solution in ethyl acetate (15 mL) was added at room temperature. After stirring for 15 minutes, diethyl ether (20 mL) was added, and formed precipitates were filtered and washed with diethyl ether. Then, the obtained solids were suspended in ethyl acetate (10 mL), and the precipitate was filtered and washed with ethyl acetate to afford the titled compound (860 mg, 3.38 mmol, 81%). IR (KBr) 3250, 2950, 1858, 1615 cm^{-1}; ^1H NMR (CD_3OD) δ 1.42 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 4.98 (s, 1H), 7.60–7.75 (m, 3H), 8.05–8.15 (m, 2H).

2-(2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-2-methylpropyl)-3-phenylcyclopropenone (48a, 48b)

To a solution of (*S*)-*N*-cyclohexylmethoxycarbonylleucine (**31**) (385 mg, 1.42 mmol) in CH_2Cl_2 (6 mL), were added triethylamine (143 mg, 1.42 mmol) and isobutyl chloroformate (194 mg, 1.42 mmol) at −5 °C, and the resulting solution was stirred at that temperature for 10 minutes. Then 2-(2-amino-1-hydroxy-2-methylpropyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (**54**) (300 mg, 1.18 mmol) and triethylamine (120 mg, 1.18 mmol) were added, and the solution was stirred for one hour. After adding 0.1 M HCl solution (5 ml), the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2. The combined extracts were washed successively with saturated NaCl solution, saturated $NaHCO_3$

solution, and saturated NaCl solution, and dried over $MgSO_4$. Removal of the solvent gave a crude solid, which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 2 : 3 to 1 : 5) to give a mixture of **48a** and **48b** (351 mg, 0.75 mmol, 64%). IR (KBr) 3300, 1857, 1695, 1648, 1623 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.65–1.05 (m, 8H), 1.05–1.90 (m, 18H), 3.68–3.95 (m, 2H), 4.00 (m, 1H), 4.70–4.88 (m, 1H), 4.99 (m, 1H), 6.50–6.93 (m, 2H), 7.40–7.60 (m, 2H), 7.40–7.60 (m, 3H), 8.01 (dd, *J* = 5.8 Hz, 1.8 Hz, 2H). Anal. Calcd for $C_{27}H_{38}N_2O_5$•$0.3H_2O$: C, 68.13; H, 8.17; N, 5.89.Found: C, 68.08; H, 8.17; N, 5.80.

2-(2-((*S*)-2-Cyclohexylmethoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-2-methylpropionyl)-3-phenylcyclopropenone (49)

To a solution of oxalyl chloride (25μL, 0.29 mmol) in CH_2Cl_2 (2 mL), dimethyl sulfoxide (41μL, 0.58 mmol) was added at −70 °C. After stirring for 15 minutes, a mixture of the alcohol **48a** and **48b** (110 mg, 0.234 mmol) was added. Then, triethylamine (0.26 mL, 1.9 mmol) was added 15 minutes later. The resulting solution was raised to room temperature during 1.5 hours, and diluted hydrochloric acid (2 mL) was added. After extraction with CH_2Cl_2, the combined extracts were washed with saturated NaCl solution and dried over $MgSO_4$. Removal of the solvent gave a crude product, which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 4 : 1) to afford the titled compound (56 mg, 0.12 mmol, 52%). mp 42–49 °C; IR (KBr) 3350, 1768, 1720, 1680 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.85–1.35 (m, 14H), 1.50 (s, 3H), 1.50–1.87 (m, 9H), 3.91 (m, 2H), 4.52 (m, 1H), 4.58–4.63 (m, 1H), 5.09 (m, 1H), 7.30–7.55 (m, 3H), 7.93–8.06 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{27}H_{36}N_2O_5$ •$0.3H_2O$: C, 68.42; H, 7.78; N, 5.91. Found: C, 68.53; H, 7.99; N, 5.88.

General procedure for the preparation of acyl compounds (**59a**, **60a**, **61a**, **62a**, **63a**,) and sulfonyl compounds (**2a, 64a**, **65a**, **66a**, **67a**, **68a**); those compounds were synthesized by condensation of 2-((1*S*, 2*S*) -2-((*S*) -2-Amino -4-methylvalerylamino) -1-hydroxy

-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (**58a**) and corresponding acid derivatives as follows;

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-*tert*-Buthoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenyl-cyclopropenone (57a) and 2-((1*R*,2*S*)-2-((*S*)-2-*tert*-Buthoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenyl-cyclopropenone (57b)

To a solution of Boc-leucine hydrate (**56**) (6.14 g, 24.7 mmol) in CH_2Cl_2 (100 mL), were added triethylamine (3.4 mL, 24.7 mmol) and isobutyl chloroformate (3.09 g, 22.6 mmol) at −5 ℃, and the resulting mixture was stirred at that temperature for 15 minutes. Then a mixture of the amine **30a** and **30b** (R^1 = isopropyl, R^2 = Ph) in 77:23 ratio (5.50 g, 20.6 mmol) and triethylamine (2.9 mL, 20.6 mmol) were added and the reaction mixture was stirred at 0 ℃ for one hour. After adding 0.1 M HCl solution (50 mL), the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (100 mL). The combined extracts were washed successively with water (50 mL), saturated $NaHCO_3$ solution (50 mL) and saturated NaCl solution (50 mL), and dried over $MgSO_4$. Then the drying agent was filtered and washed with CH_2Cl_2 (20 mL). Concentration of the solution gave a crude mixture, which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 1 : 1 to 1 : 4) to afford **57a** (5.74 g, 12.9 mmol, 63%) and **57b** (1.77 g, 3.98 mmol, 19%).

57a: mp 158–161 ℃; IR (KBr) 3330, 2961, 1858, 1685, 1655, 1625 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.75 (d, *J* = 6.4 Hz, 6 H), 1.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 1.17–1.60 (m, 3 H), 1.39 (s, 9 H), 2.39 (m, 1 H), 3.65 (m, 1 H), 4.04 (m, 1 H), 5.02–5.18 (m, 2 H), 6.25 (m, 1 H), 7.33 (m, 1 H), 7.45–7.60 (m, 3 H), 7.95–8.05 (m, 2 H).

57b: mp 182–161 ℃; IR (KBr) 3380, 3260, 1860, 1825, 1708, 1655, 1625 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.68 (d, *J* = 5.6 Hz, 6 H), 1.08 (d, *J* = 6.6 Hz, 3 H), 1.11 (d, *J* = 6.7 Hz, 3 H), 1.25–1.55 (m, 3 H), 1.38 (s, 9 H), 2.13 (m, 1 H), 3.98–4.13 (m, 2 H), 5.04 (d, *J* = 6.9 Hz, 1 H), 5.13 (dd, *J* = 6.4 Hz, 3.0 Hz, 1 H), 5.35 (d, *J* = 6.4 Hz, 1 H), 8.95 (d, *J* = 7.0 Hz, 1 H), 7.45–7.65 (m, 3 H), 7.98–8.07 (m, 2 H).

2-((1*S*, 2*S*) -2-((*S*) -2-Amino -4-methylvalerylamino) -1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (58a)

Compound **57a** (5.74 g, 12.9 mmol) was dissolved in ethanol (30 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Then, concentrated HCl (15 mL) was added and the resulting mixture was stirred at room temperature for 40 minutes. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. After dried *in vacuo* at room temperature, diethyl ether (50 mL) was added and the resulting suspension was stirred for an hour. The precipitates were filtered and washed with diethyl ether (10 mL), and then dried *in vacuo* at room temperature for 8 hours to afford the titled compound (4.84 g, 12.7 mmol, 99%). mp 147–153°C(decomp); IR (KBr) 3260, 1858, 1675, 1616 cm^{-1}; ^1H NMR (CD_3OD) δ 0.47 (d, J = 6.5 Hz, 3 H), 0.71 (d, J = 6.5 Hz, 3 H), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 3 H), 1.12 (d, J = 6.7 Hz, 3 H), 1.20 (m, 2 H), 1.42 (m, 1 H), 2.10 (m, 1 H), 3.81 (dd, J = 8.9 Hz, 6.1 Hz, 1 H), 4.11 (dd, J = 9.7, 2.2 Hz, 1 H), 5.23 (d, J = 2.2 Hz, 1 H), 7.55–7.70 (m, 3 H), 8.03–8.13 (m, 2 H).

2-((1*S*, 2*S*)-1-Hydroxy-3-methyl-2-((*S*)-4-methyl -2-phenylsulfonylaminovalerylamino)butyl) -3-phenylcyclopropenone (2a)

To a solution of **58a** (1.13 g, 2.97 mmol) and benzenesulfonyl chloride (0.38 mL, 2.97 mmol) in CH_2Cl_2 (30 mL), triethylamine (0.83 mL, 5.94 mmol) was added at 0 °C, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 2 hours. After adding 0.1 M HCl solution (15 mL), the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 twice (total 30 mL). Combined extracts were successively washed with water (15 mL), saturated $NaHCO_3$ solution (15 mL), and saturated NaCl solution (15 mL), and dried over $MgSO_4$. The drying agent was removed and washed with CH_2Cl_2 (10 mL), and then the filtrate was evaporated to give a crude mixture. Purification by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 1 : 2) gave solids (1.13 g), which was suspended in CH_2Cl_2 (4 mL). Precipitates were filtered and washed with CH_2Cl_2 (0.5 mL) to afford the titled compound (921 mg, 1.90 mmol, 64%). mp 207 °C (decomp); IR (KBr) 3450, 3300, 1858, 1665, 1625 cm^{-1}; ^1H NMR

(CD_3OD) δ 0.38 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.40 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.78 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.02 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.75–0.95 (m, 2H), 1.34 (m, 1H), 1.97 (m, 1H), 3.71 (dd, *J* = 10 Hz, 4.4 Hz, 1H), 3.92 (dd, *J* = 9.4 Hz, 2.5 Hz, 1H), 5.14 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.42–7.70 (m, 6H), 7.81 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.6 Hz, 2H), 8.03 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.2 Hz, 2H). Anal. Calcd for $C_{26}H_{32}N_2O_5S$: C, 64.44; H, 6.66; N, 5.78; S, 6.62. Found: C, 64.33; H, 6.64; N, 6.08; S, 6.68.

Water solubility of compound 2a

Compound **2a** (25 mg) was suspended in distilled water (5 mL) and the resulting suspension was stirred at 27 °C. After 6 hours, the suspension was left for 30 minutes and filtrated with 0.45μm membrane filter. The area of the sample (10 μL) was measured by HPLC (column: Inertsil ODS-2, eluent: methanol : water = 3 : 2, flow rate: 1 mL / min, UV detection: 254 nm, temperature: 27 °C). Water solubility of compound **2a** was calculated by using the calibration curve.

LogP (HPLC method) [104] of compound 2a

Thiourea (1 mg), phenol (10 mg), nitro-benzene (1 μL), benzene (50 μL) and toluene (50 μL) were dissolved in methanol (50 mL). Then compound **2a** (1.2 mg) was added to the standard solution (20 mL). LogP value was calculated by using the retention time of HPLC (column: Inertsil ODS-2, eluent: methanol : water = 3 : 2, flow rate: 1 mL / min, UV detection: 254 nm, temperature: 25 °C) by comparison with internal standards.

2-((1*S*, 2*S*)- 2-((*S*)-2-Benzoylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutl)-3-phenylcyclopropenone (59a)

mp 150–154°C; IR (KBr) 3297, 1856, 1632 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ0.63–0.80 (m, 6H), 0.91 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.35–1.65 (m, 3H), 2.22 (m, 1H), 3.42 (m, 1H), 4.48 (m, 1H), 4.78 (m, 1H), 6.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.28–7.55 (m, 6H), 7.60–7.68 (m, 3H), 7.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.85–7.95 (m, 2H).

2-((1*S*, 2*S*)-1-Hydroxy-3-methyl-2-((*S*)-4-methyl-2-nicotinoylaminovalerylamino) butyl)-3-phenylcyclopropenone (60a)

mp 108–115 °C; IR (KBr) 3299, 1856, 1642 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ0.63–0.80 (m, 6H), 0.92 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.34–1.72 (m, 3H), 2.23 (m, 1H), 3.58 (m, 1H), 4.59 (m,

1H), 5.30 (m, 1H), 6.58 (m, 1H), 7.25 (m, 1H), 7.35–7.55 (m, 3H), 7.92 (dd, *J* = 6.7 Hz, 1.4 Hz, 2H), 8.02–8.18 (m, 2H), 8.32 (m, 1H), 8.59 (dd, *J* = 4.8 Hz, 1.5 Hz, 1H), 9.11 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H).

2-((1*S*, 2*S*)-2-(2-Furoylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone (61a)

mp 101–105°C; IR (KBr) 3330, 1857, 1640 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.80 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H), 1.01 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.08 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.40–1.65 (m, 3H), 2.37 (m, 1H), 3.67 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 5.14 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 6.43 (dd, *J* = 3.7 Hz, 1.8 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 7.35 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.40–7.55 (m, 3H), 7.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.91 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1.5 Hz, 2H).

2-((1*S*, 2*S*)-1-Hydroxy-3-methyl-2-((*S*)-4-methyl-(3-phenylpropionylamino)valerylamino) butyl)-3-phenylcyclopropenone (62a)

mp 148 °C; IR (KBr) 3387, 1854, 1640 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.67 (d, *J* = 3.9 Hz, 6H), 0.95 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.06 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 1.18–1.40 (m, 3H), 2.27 (m, 1H), 2.43 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 3.70–3.90 (m, 2H), 3.74 (m, 1H), 4.39 (m, 1H), 5.09 (m, 1H), 6.19 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.07–7.30 (m, 5H), 7.40–7.60 (m, 4H), 7.96 (dd, *J* = 6.6 Hz, 1.7 Hz, 2H).

2-((1*S*, 2*S*)-1-Hydroxy-3-methl-2-((*S*)-4-methyl-2-phenoxyacetylaminovalerylamino)butyl) -3-phenylcyclopropenone (63a)

mp 138–139°C; IR (KBr) 3290, 1856, 1648, 1620 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.78 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H), 1.02 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.09 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.30–1.60 (m, 3H), 2.38 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 4.26 (d, *J* = 15 Hz, 1H), 4.37 (d, *J* = 15 Hz, 1H), 4.49 (m, 1H), 5.14 (m, 1H), 6.12 (m, 1H), 6.84 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.01 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.25–7.38 (m, 2H), 7.38–7.53 (m, 3H), 7.66 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.85–7.98 (m, 2H).

2-((1*S*, 2*S*)-2-((*S*)-2-(2-Chlorophenylsulfonylaminovalerylamino)-4-methylbutyl) -3-phenylcyclopropenone (64a)

mp 106–109 °C (decomp); IR (KBr) 3327, 1856, 1624 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.38 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.53 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.10 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.12 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.27 (m, 2H), 1.41 (m, 1H), 2.38 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.93 (m, 1H), 5.21 (d, *J* = 4.3 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 6.2 Hz,

1H), 7.31–7.42 (m, 2H), 7.42–7.60 (m, 5H), 8.01 (dd, *J* = 6.8 Hz, 1.4 Hz, 2H), 8.03 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H).

2-((1*S*, 2*S*)-1-Hydroxy-3-methyl-2-((*S*)-4-methyl-2-phenylsulfonylaminovalerylamino)butyl) -3-phenylcyclopropenone (65a)

mp 214 °C (decomp); IR (KBr) 3551, 3474, 3264, 1856, 1669, 1634 cm^{-1}; ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 0.23–0.45 (m, 9H), 0.75 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.65–0.85 (m, 1H), 0.85–1.05 (m, 1H), 1.34 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 3.64 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 4.99 (m, 1H), 6.24 (m, 1H), 7.46–8.10 (m, 13H), 8.33 (m, 1H).

2-((1*S*, 2*S*)-1-Hydroxy-3-methyl-2((*S*)-4-methyl-2-phenylsulfonylaminovalerylamino)butyl) -3-phenylcyclopropenone (66a)

mp 110–112 °C; IR (KBr) 3285, 1856, 1672, 1624 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.13 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.42 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.87 (m, 1H), 1.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 1.24 (m, 2H), 2.24 (m, 1H), 3.53 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 5.29 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H), 5.76 (s, 1H), 7.38–7.55 (m, 4H), 7.68 (s, 1H), 8.01 (dd, *J* = 7.6 Hz, 1.4 Hz, 2H), 8.17 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 1.7 Hz and 1.7 Hz, 1H), 8.48 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 8.74 (dd, *J* = 4.8 Hz, 1.5 Hz, 1H), 9.10 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H).

2-((1*S*, 2*S*)-2((*S*)-2-Benzylsulfonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy -3-methylbutyl) -3-phenylcyclopropenone (67a)

mp 197 °C (decomp); IR (KBr) 3314, 1856, 1678, 1624 cm^{-1}; ^1H NMR (DMSO-d_6) δ 0.39 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 0.57 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.78–1.0 (m, 2H), 0.95 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 1.04 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.42 (m, 1H), 1.99 (m, 1H), 3.83–4.07 (m, 2H), 4.05 (d, *J* = 14 Hz, 1H) , 4.14 (d, *J* = 14 Hz, 1H), 5.14 (m, 1H), 6.38 (m, 1H), 7.33 (s, 5H), 7.20–7.45 (m, 1H), 7.53–7.73 (m, 3H), 7.94 (dd, *J* = 7.1 Hz, 1.5 Hz, 2H), 8.14 (d, *J* = 9.4 Hz, 1H).

2-((1*S*, 2*S*)-1-Hydroxy-3-methyl-2((*S*)-4-methyl-2-pyridylmethoxycarbonylamino) valerylamino) butyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (68a)

2-Pyridylmethanol (573 mg, 5.26 mmol) and disuccinimidyl carbonate (1.35 g, 5.26 mmol) were dissolved in CH_2Cl_2 (100 mL), and the resulting solution was stirred at room temperature overnight. Then, 2-((1*S*, 2*S*)-2-((*S*)-2-Amino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-

3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (**58a**) (2.0 g, 5.26 mmol) and triethylamine (531 mg, 5.26 mmol) were added. After the solution was stirred at room temperature for 1.5 hours, further triethylamine (531 mg, 5.26 mmol) was added, and it was stirred for 2.5 hours. After adding water (50 mL), the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2. The combined extracts were washed successively with water, saturated $NaHCO_3$ solution, and saturated NaCl solution, and dried over $MgSO_4$. Removal of the solvent gave a crude solid, which was purified by column chromatography on silica gel (from ethyl acetate to ethyl acetate:methanol = 25 : 1) to give a solid, which was dissolved in ethyl acetate (10 mL). Then, 4 M HCl solution in ethyl acetate (2 mL, 8 mmol) and ethyl acetate (30 mL) were added, and formed precipitates were filtered and washed successively with ethyl acetate and diethyl ether. The precipitates were suspended in ethyl acetate (15 mL), and precipitates were filtered and washed with ethyl acetate to give the titled compound (1.54 g, 2.99 mmol, 57%).

mp 158–160 °C (dec.); IR (KBr) 3300, 1858, 1715, 1660, 1630 cm^{-1}; NMR (CD_3OD) δ 0.71 (d, *J* = 7.4 Hz, 6H), 1.03 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.11 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.38–1.65 (m, 3H), 2.42 (m, 1H), 4.09 (m, 1H), 4.20 (m, 1H), 4.95–5.28 (m, 3H), 5.43 (m, 1H), 5.78 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.15–7.38 (m, 3H), 7.38–7.62 (m, 3H), 7.62–7.78 (m, 1H), 7.97 (d, *J* = 7.0 Hz, 2H), 8.54 (s, 1H).

2. Experimental section for Chapter III

General

Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA was purchased from Peptide Institute. m-Calpain was purified from rat brain, and cathepsin L was purified from rat kidney according to the reported method[105 106]. Z-Phe-Arg-MCA, Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide, H-$_D$-Phe-Pip-Arg-*p*-nitroanilide, papain, cathepsin B, cathepsin D, cathepsin G, and thrombin were purchased from Sigma.

m-Calpain inhibitory activity

To a imidazole–HCl buffer (pH 7.3) (910 μL) containing 5 mM $_L$-cysteine and 2.5 mM 2-mercaptoethanol, were added Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (5 mM in DMSO, 40 μL), DMSO solution of an inhibitor (10 μL), and m-calpain (30 μL). Then immediately after the addition of 500 mM $CaCl_2$ (10 μL), the resulting solution was incubated for 10 minutes at 30 °C, during that time

increase of fluorescence (excitation at 380 nm; emission at 460 nm) was recorded. The inhibitory activity was calculated by the comparison of average hydrosis rate with control run which was performed in the absence of the inhibitor. Lineweaver–Burk plots were calculated from the following assays; the inhibitor concentrations were 0, 0.5, and 1.0 mM, and substrate concentrations were 0, 0.05, 0.067, 0.1, and 0.2 mM.

Papain inhibitory activity

To a 400mM sodium potassium phosphate buffer (pH 6.8) (120 μL) containing 8 mM dithiothreitol and 4 mM EDTA, were added DMSO solution of an inhibitor (5 μL) and papain in 0.1% Brij 35 solution (250 μL). The resulting solution was incubated for 5 min at 40 °C, and 20 mM Z-Phe-Arg-MCA in 0.23% DMSO solution (125 μL) was added. After incubating for 10 min at 40 °C, 100 mM sodium chloroacetate in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.3) (500 μL) was added to it, and the fluorescence (excitation at 380 nm; emission at 460 nm) was recorded. The inhibitory activity was calculated by the comparison of the control run which was performed in the absence of the inhibitor.

Cathepsin B inhibitory activity

It was assayed under a similar manner to the papain inhibitory activity, except that the pH of the buffer was 6.0.

Cathepsin L inhibitory activity

It was assayed under a similar manner to the papain inhibitory activity, except that the pH of the buffer was 5.5 and the incubation temperature was 30 °C.

Cathepsin G inhibitory activity

To a 0.1M HEPES buffer (pH 7.5) (425 μL) containing 0.5 M NaCl and 0.1% Brij 35, were added DMSO solution of an inhibitor (5 μL) and cathepsin G solution (30 μL). The resulting solution was incubated for 5 minutes at 37 °C, and 125 mM Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide in DMSO (40 μL) was added. After incubating for 15 minutes at 37 °C, 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.3) (500 μL) was added to it, and the absorbance at 410 nm was recorded. The inhibitory activity was calculated by the comparison of the control run which was performed in the absence of the inhibitor.

Thrombin inhibitory activity

It was assayed under a similar manner to the cathepsin G inhibitory activity, except that the buffer was 0.1 M Tris–HCl buffer (pH 8.0) and the substrate was H-$_{D}$-Phe-Pip-Arg-*p*-nitroanilide.

Cathepsin D inhibitory activity

Hemoglobin substrate powder (16 g) was dissolved in water (100 mL), and adjusted to pH 7.5 with a 4 M NaOH solution. The pH was maintained at 7.5 with NaOH while succinic anhydride (5 g) was added to the solution. After the reaction had ceased, the hemoglobin was acidified to pH 2.5 and dialyzed at room temperature against 0.1 M acetic acid (100 volumes). Final adjustment to a 4% solution was made with 0.1 M sodium acetate buffer (pH 4.0). Four percent substrate buffer (100 μL) and an inhibitor were placed into a test tube and it was incubated for 5 mininutes at 37 °C. Cathepsin D in sodium acetate buffer (pH 4.0) (100 μL) was added, and the resulting solution was incubated for 10 minutes at 37 °C. Then 10 μL was withdrawn and placed into 0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) (2 mL). Then the tube received 0.1 mg / mL fluorescamine in acetone (1 mL) followed by rapid mixing. The emission at 475 nm was measured and the inhibitory activity was calculated by the comparison of the control run which was performed in the absence of the inhibitor.

Investigation of reversible or irreversible inhibition

To an imidazole–HCl buffer (pH 7.3) (54 μL) containing 5 mM $_L$-cysteine and 2.5 mM 2-mercaptoethanol, were added Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (5mM in DMSO, 4 μL), DMSO solution of an inhibitor (1 μL), and m-calpain (40 μL). Then 500 mM $CaCl_2$ (1 μL) was added, and the resulting solution was incubated for a while (0, 5, 10, 15, 20 min) at 30 °C. After stopping the reaction by the addition of 100 mM EDTA (5 μL), 50μL was separated and were added Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA (5 mM in DMSO, 40 μL) and imidazole–HCl buffer (pH 7.3) (900 μL). Immediately after the addition of 500 mM $CaCl_2$ (10 μL), the resulting solution was incubated for 10 minutes at 30 °C, during that time increase of fluorescence (excitation at 380 nm; emission at 460 nm) was recorded and the average hydrolysis rate was plotted.

3. Experimental section for Chapter IV

Phenylacetone (73) (Research Approval No.: Kanagawa 3604)

Magnesium (21.38 g, 0.88 mol) was added to a mixture of diethyl ether (20 mL) and carbon tetrachloride (2 mL), and the temperature of the resulting suspension was raised to start the reaction. After adding further diethyl ether (300 mL), diethyl malonate **70** (140.8 g, 0.88 mol) in ethanol (80 mL) and diethyl ether (100 mL) was added for 30 minutes, and the mixture was refluxed for 3 hours. Then, phenylacetyl chloride **71** (123.6 g, 0.80 mol) in diethyl ether (90 mL) was added for 40 minutes, and the resulting solution was stirred for 2 hours. The solution was cooled to 10 °C, and 2 M H_2SO_4 solution (500 mL) and water (200 mL) were added slowly. The aqueous layer was extracted with diethyl ether, and combined extracts were washed with saturated NaCl solution. After drying over $MgSO_4$, the solvent was evaporated to give the intermediate **72** (236.82 g), which was dissolved in ethyl acetate (240 mL), water (160 mL), and concentrated H_2SO_4 (30 mL). The resulting solution was refluxed for 8 hours, and it was cooled to room temperature. Then, 20% NaOH solution (1000 mL) was added slowly, and the aqueous layer was extracted with ethyl acetate. Combined extracts were washed with saturated NaCl solution and dried over $MgSO_4$. Evaporation of the

solvent gave a crude oil, which was purified by distillation (100.5–102 °C / 13 mmHg) to afford the titled compound (94.98 g, 0.71 mol, 89%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 2.15 (s, 3H), 3.69 (s, 2H), 7.15–7.40 (m, 5H).

2-Bromomethyl-2-(chlorophenylmethyl)-5,5-dimethyl-1,3-dioxane (76)

Phenylacetone **73** (90.56 g, 0.676 mol) was dissolved in dichloromethane (500 mL), and sulfuryl chloride (66.0 mL, 0.816 mol) was added slowly at 0 °C. After stirring at room temperature for 7 hours, water (400 mL) was added, and the separated aqueous layer was extracted twice with dichloromethane. Then the combined extracts were washed with saturated NaCl solution and dried over anhydrous $MgSO_4$. Removal of the drying agent and concentration afforded crude α-chloroketone **74** (119.6 g), which was used without purification. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 2.23 (s, 3H), 5.35 (s, 1H), 7.35–7.47 (m, 5H).

To a solution of the crude α-chloroketone **74** (119.6 g) in toluene (700 mL), were added neopentyl glycol (105.4 g, 1.01 mol) and *p*-toluenensulfonic acid monohydrate (2.57 g, 13.5 mmol). Then the mixture was refluxed for 7 hours in a Dean-Stark apparatus with continuous removal of separated water. After cooling to room temperature, *n*-hexane (1000 mL) was added, and the resulting solid was removed by filtration and washed with *n*-hexane. The filtrate was washed with diluted $NaHCO_3$ solution, water, and saturated NaCl solution successively and dried over anhydrous Na_2SO_4. Removal of the drying agent and concentration afforded crude acetal **75** (174.3 g, containing a small amount of toluene), which was used without purification. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.80 (s, 3 H), 0.99 (s, 3 H), 1.41 (s, 3 H), 3.48 (dd, J = 11.4 Hz, 1.7 Hz, 1 H), 3.50 (dd, J = 11.7 Hz, 1.7 Hz, 1 H), 3.62 (d, J = 11.4 Hz, 1 H), 3.63 (d, J = 11.7Hz, 1 H), 4.97 (s, 1 H), 7.20–7.35 (m, 3 H), 7.45–7.55 (m, 2 H).

This crude acetal **75** (174.3 g, containing a small amount of toluene) was dissolved in chloroform (1400 mL), and pyridinium hydrobromide perbromide (230.0 g, 0.72 mmol) was added. After refluxing for 30 minutes, it was cooled to room temperature, and then water (1000 mL) was added.

The aqueous layer was extracted with chloroform, and the combined extracts were washed with water, saturated $NaHCO_3$ solution, and saturated NaCl solution successively and dried over anhydrous Na_2SO_4. Removal of the drying agent and concentration afforded a crude product, which was recrystallized from *n*-hexane to give the desired compound **76** (148.2 g, 0.444 mol, 66%). mp 81–82 °C; IR (KBr) 2959, 2868, 1472, 1453, 1426, 1395, 1208, 1129, 1265, 1020, 988, 766, 704 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.77 (s, 3 H), 0.81 (s, 3H), 3.38–3.65 (m, 5H), 3.94 (d, J = 11.7 Hz, 1H), 5.29 (s, 1H), 7.25–7.40 (m, 3 H), 7.45–7.60 (m, 2 H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) 21.66, 21.69, 27.21, 29.07, 62.94, 70.44, 70.61, 97.25, 127.20, 127.93, 129.24, 135.94. Anal. Calcd for $C_{14}H_{18}BrClO_2$: C, 50.40; H, 5.44; Br, 23.59; Cl, 10.63. Found: C, 50.30; H, 5.37; Br, 23.71; Cl, 10.34.

2-Phenylcyclopropenone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (21): synthesized from bromo-chloro-compound **76** by using *t*-BuOK (**figure 4.4**)

To a solution of *t*-BuOK (672 mg, 6.0 mmol) in DMI (5 mL), was added 2-bromomethyl-2-(chlorophenylmethyl)-5,5-dimethyl-1,3-dioxane (**76**) (1.0 g, 3.0 mmol) in THF (5 mL) at 0 °C. After stirring for 4 hours at 0 °C, water (20 mL) was added, and then the aqueous solution was extracted with *n*-hexane three times. The combined extracts were washed with saturated NaCl solution and dried over anhydrous Na_2SO_4. Removal of the drying agent and concentration gave a crude product, which was purified by flush column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 19 : 1) to afford the titled compound (453 mg, 2.1 mmol, 70%). mp 54 °C; IR (KBr) 3100, 2250, 1960, 1900, 1810, 1720, 1470, 1260 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 1.08 (s, 3 H), 1.15 (s, 3 H), 3.75 (s, 4 H), 7.35–7.47 (m, 3 H), 7.60–7.67 (m, 2 H), 7.69 (s, 1 H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) 21.78, 22.00, 29.95, 77.26, 82.69, 114.12, 125.45, 128.29, 129.13, 129.52, 135.18. Anal. Calcd for $C_{14}H_{16}O_2$: C, 77.75; H, 7.46. Found: C, 77.64; H, 7.54.

2-Chloro-2-phenylcyclopropanone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (82); Compound **82** was isolated by column chromatography on silica gel as a by-product in the study for **table 4.1**.

mp 87 °C; IR (KBr) 2961, 2872, 1473, 1445, 1422, 1364, 1343, 1310, 1258, 1242, 1171, 1088, 1071, 1042, 1020, 984, 953, 916, 735, 700, 658, 648, 617 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.85 (s, 3 H), 1.15 (s, 3 H), 1.68 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 2.07 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H), 3.19 (s, 2 H), 3.68 (d, *J* = 11 Hz, 1 H), 3.84 (d, *J* = 11 Hz, 1 H), 7.25–7.40 (m, 3 H), 7.45–7.60 (m, 2 H). Anal. Calcd for $C_{14}H_{17}ClO_2$: C, 66.53; H, 6.78; Cl, 14.03. Found: C, 66.17; H, 6.69; Cl, 13.90.

2-*tert*-Butoxy-3-phenylcyclopropanone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (81): synthesized from bromo-chloro-compound **76** (**figure 4.5**)

To a solution of 2-bromomethyl-2-(chlorophenylmethyl)-5,5-dimethyl-1,3-dioxane (**76**) (185 g, 0.56 mmol) in THF (750 mL), *t*-BuOK (155 g, 1.4 mmol) was added slowly at 0 °C. The resulting solution was then stirred overnight at room temperature, and THF (about 350 mL) was removed *in vacuo*. After addition of water to the residue, the water layer was extracted with *n*-heptane three times. Combined extracts were washed with saturated NaCl solution and dried over anhydrous Na_2SO_4. After filtration of the drying agent, the filtrate was evaporated to give crude solids (164.1 g), which was dissolved in 2-propanol (300 mL) by heating. After the solution was cooled to 0 °C, water (350 mL) was added slowly. The precipitates formed were filtered and washed with 2-propanol–water mixture (1 : 1) to afford the desired compound (147.8 g, 0.51 mmol, 92%). mp 75–76 °C; IR (KBr) 2984, 2961, 2868, 1603, 1495, 1474, 1458, 1393, 1366, 1192, 1165, 1123, 1082, 1065, 1049, 897, 883, 696, 630 cm^{-1}; ^1H NMR ($CDCl_3$) δ 0.72 (s, 3 H), 1.20 (s, 3 H), 1.27 (s, 9 H), 2.25 (d, *J* = 4.9 Hz, 1 H), 3.04 (d, *J* = 10.8 Hz, 1 H), 3.32 (dd, *J* = 10.8 Hz, 2.1 Hz, 1 H), 3.62 (d, *J* = 10.7 Hz, 1 H), 3.66 (d, *J* = 4.9 Hz, 1 H), 3.72 (dd, *J* = 10.7 Hz, 2.1 Hz, 1 H), 7.10–7.25 (m, 3 H), 7.25–7.35 (m, 2 H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ 21.44, 22.25, 27.49, 30.57, 37.91, 61.44, 74.82, 75.15,

90.72, 125.12, 126.22, 127.76, 136.44. Anal. Calcd for $C_{18}H_{26}ClO_3$: C, 74.45; H, 9.02. Found: C, 74.54; H, 9.09.

2-Phenylcyclopropenone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (21): synthesized from *tert*-butanol adduct **81** (**figure 4.7**)

To a solution of 2-*tert*-butoxy-3-phenylcyclopropanone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (**81**) (1.00 g, 3.4 mmol) in THF (10 mL), TMEDA (1.03 mL, 6.9mmol) was added at −60 °C. *n*-BuLi (1.61 M solution in *n*-hexane, 4.29 mL, 6.9 mmol) was then added at −60 °C for 5 minutes, and the resulting solution was stirred at that temperature for 2 hours. After 4 : 1 mixture of THF–water (3 mL) was added at −60 °C, the reaction mixture was warmed to room temperature, and anhydrous Na_2SO_4 was added. Subsequently, solids in this solution were filtered by a pad of Celite, and the filtrate was evaporated to give the crude mixture (894 mg). Purification by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 20 : 1) afforded the desired compound (579 mg, 2.7 mmol, 78%). Spectroscopic properties were identical with ones shown in page 79.

2-((2*S*)-2-*tert*-Butoxycarbonylamino-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (78a and 78b): synthesized from *tert*-butanol adduct **81** (**figure 4.8**)

2-*tert*-Butoxy-3-phenylcyclopropanone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (**81**) (996 mg, 3.4 mmol) was dissolved in THF (10 mL), and TMEDA (0.97 mL, 6.5 mmol) was added. The resulting solution was then cooled to −60 °C, and *n*-BuLi (1.63 M solution in *n*-hexane, 3.98 mL, 6.5 mmol) was added for 5 minutes. After stirring for 1.5 hours at that temperature, a cooled suspension of anhydrous $CeCl_3$, which was prepared from $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ (1.92 g, 5.2 mmol) by drying *in vacuo* at 140 °C for 3.5 hours, in THF (20 mL) was slowly added, and the resulting suspension was stirred for 50 minutes at −60°C. Subsequently, (*S*)-*N*-*tert*-butoxycarbonylvalinal (**77**) (293 mg, 1.5 mmol) in

THF (5 mL) was added for 10 minutes, and the resulting mixture was stirred at −60 °C for 3.5 hours. The reaction mixture was then quenched by addition of 4 : 1 mixture of THF–water (3 mL) at −60 °C, and it was warmed to room temperature. Then anhydrous Na_2SO_4 was added to the resulting suspension; solids were filtered by a pad of Celite and were washed three times with ethyl acetate. Evaporation of the filtrate afforded the crude mixture (1.44 g), which was purified by column chromatography on silica gel (*n*-hexane : ethyl acetate = 4 : 1) to give a mixture of **78a** and **78b** in 75 : 25 ratio (484 mg, 1.2 mmol, 79% yield base on aldehyde **77**). IR (KBr, a mixture of **78a** and **78b**) 3430, 2960, 1855, 1800, 1710, 1690 cm^{-1}; ^1H NMR (CD_3OD, a mixture of **78a** and **78b**) δ 0.95–1.60 (m, 12H), 1.38 (s, 3H), 1.42 (s, 6H), 1.95–2,15 (m, 1H), 3.60–3.75 (m, 1H), 3.75–3.95 (m, 4H), 5.00–5.10 (m, 1H), 6.03 (d, *J* = 10 Hz, 0.33H), 6.23 (d, *J* = 10 Hz, 0.67H), 7.40–7.65 (m, 3H), 7.70–7.90 (m, 2H). Anal. Calcd for $C_{24}H_{35}NO_5$, a mixture of **78a** and **78b**: C, 68.59; H, 8.89; N, 3.28. Found: C, 68.20; H, 8.77; N, 3.24.

2-((2*S*)-2-Amino-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (79a and 79b): synthesized via zinc amid of aldehyde **77** (**figure 4.13**)

2-*tert*-Butoxy-3-phenylcyclopropanone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (**81**) (4.96g, 17.1 mmol) was dissolved in THF (50 mL), and TMEDA (5.1 mL,) was added. Then the resulting solution was cooled to −70 °C, and *n*-BuLi (1.61 M solution in *n*-hexane, 21.1 mL, 34.1 mmol) was added. After stirring 1.5 hours at that temperature, a cooled suspension of anhydrous $CeCl_3$, which was prepared from $CeCl_3 \cdot 7H_2O$ (12.7g, 34.1 mmol) by drying *in vacuo* at 140 °C for 6 hours, in toluene (100 mL) was added and the resulting suspension was stirred at −70 °C for 45 minutes. Subsequently, (*S*)-*N*-*tert*-butoxycarbonylvalinal (**77**) (2.86g, 14.2 mmol) in THF (28 mL), which was treated with diethylzinc (1.0 M solution in *n*-hexane, 14.3 mL, 14.3 mmol) at −70 °C, was added for 10 minutes, and the resulting mixture was stirred at −70 °C for 3.5 hours. The reaction mixture was quenched by the addition of water (2 mL) in THF (10 mL) at −70 °C, and the temperature of it was raised to room

temperature. Then the resulting suspension was filtered by a pad of Celite and washed three times with ethyl acetate. After the filtrate was dried over anhydrous Na_2SO_4, the solvent was evaporated to afford the crude mixture. Then, the solution of the above crude mixture in ethyl acetate (135 mL) was washed with 0.5 M HCl solution twice and saturated NaCl solution. After removal of the solvent, the oily residue was dissolved in 4 M HCl solution in ethyl acetate (30 mL), and the resulting mixture was stirred for 30 minutes at room temperature. The formed precipitates were filtered and washed with ethyl acetate to afford a mixture of **79a** and **79b** in 71 : 29 ratio (2.69 g, 10.1 mmol, 59% based on **81**). Spectroscopic properties were identical with ones shown in page 59.

Procedure of **figure 4.18**

5,5-Dimethyl-2-methyl-2-(phenylmethyl)-1,3-dioxane (90)

2,2-Dimethyl-1,3-dioxane-4,6-dione (**89**) (30.7g, 213 mmol) was dissolved in DMF (80 mL), and it was cooled to −10 °C. Pyridine (35.4 g, 448 mmol) and phenylacetyl chloride (**71**) (34.6g, 224 mmol) in DMF (30 mL) were added to the solution below −4 °C for 90 minutes. After stirring at −5 °C for 2 hours and then at 0 °C for 3.5 hours, 1 M HCl (240 mL) and water (60 mL) were added to the solution. Then, the reaction mixture was stirred for an hour at room temperature. The precipitates were filtered and washed with water, and dried *in vacuo* at 40 °C for 30 hours to afford the titled compound (50.5 g, 193 mmol, 91%). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 1.72 (s, 6H), 4.43 (s, 2H), 7.20–7.42 (m, 5H).

2-Methyl-2-(phenylmethyl)-5,5-dimethyl-1,3-dioxane (91)

To a solution of the compound **90** (12.2g, 46.5 mmol) in toluene (90 mL), *t*-BuOH (6.87 g, 92.9 mmol) was added, and the resulting solution was stirred at 65 °C for 2 hours to distill acetone (a by-product) (13 mL). Then, *p*-toluenensulfonic acid monohydrate (441 mg, 2.32 mmol) was added to the solution and it was refluxed for 5 hours. Next, neopentyl glycol (5.31 g, 51.1 mmol) was

added and the reaction mixture was refluxed for 6 hours. Formed *tert*-butyl alcohol and water were removed with toluene and 50 mL of toluene was added twice during this refluxing time. After the solution was cooled to room temperature, 1% K_2CO_3 solution (50 mL) was added. Then, separated aqueous layer was extracted with toluene (40 mL) twice. The combined extracts were washed successively with water (40 mL) and saturated NaCl solution (40 mL), and dried over Na_2SO_4. The drying agent was removed and washed with toluene (20 mL), and then the filtrate was concentrated to afford the crude **91** (11.0 g)**,** which was used without purification. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.91 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 1.28 (s, 3H), 3.01 (s, 2H), 3.56 (s, 4H), 7.10–7.40 (m, 5H).

2-Bromomethyl-2-(bromophenylmethyl)-5,5-dimethyl-1,3-dioxane (92)

Pyridinium hydrobromide perbromide (29.8 g, 93.0 mmol) was dissolved in 1,2-dichloroethane (90 mL), and the resulting solution was heated to 75 °C. Then, the above crude **91** (11.0 g) in 1,2-dichloroethane (15 mL) was added for 15 minutes, and it was refluxed for 15 minutes. After cooled to room temperature, the reaction mixture was filtrated and washed with 1,2-dichloroethane (15 mL). To the filtrate, water (80 mL) was added and the separated aqueous layer was extracted with 1,2-dichloroethane (40 mL). Combined extracts were washed successively with water (50 mL), saturated $NaHCO_3$ solution (30 mL), and saturated NaCl solution (20 mL), and dried over Na_2SO_4. The drying agent was filtered and was washed with 1,2-dichloroethane, and the filtrate was concentrated. After ethanol (50 mL) was added to the residue, the solvent was removed. Then, ethanol (63 mL) and water (7 mL) were added to the residue and the mixture was heated to solve the residue. After cooling slowly to 25 °C, the mixture was stirred at 0 °C for 2.5 hours. The precipitates formed were filtered and washed with cooled ethanol–water mixture (9 : 1). The resulting crystals were dried *in vacuo* at 40 °C for 8 hours to afford the titled compound (11.2g, 29.6 mmol, 64%). mp 75–76 °C. ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ 0.79 (s, 3H), 1.03 (s, 3H), 3.38 (d, J = 11 Hz, 1H), 3.45–3.65 (m, 4H), 4.01 (d, J = 11 Hz, 1H), 5.35 (s, 1H), 7.27–7.35 (m, 3H), 7.53–7.60 (m, 2H).

2-*tert*-Butoxy-3-phenylcyclopropanone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (81)

To a solution of *t*-BuOK (1.2 kg, 11 mol) in THF (3 L), 2-bromomethyl-2-(bromophenylmethyl)-5,5-dimethyl-1,3-dioxane (**92**) (1.6 kg, 4.2 mol) in THF (4 L) was added slowly at 5 °C. After stirring at room temperature for 5 hours, the solvent (3.5 L) was removed *in vacuo*. Then *n*-heptane (6 L) and water (6 L) were added and the separated aqueous layer was extracted with *n*-heptane (4 L) twice. Combined extracts were washed with saturated NaCl solution (5 L) and dried over anhydrous Na_2SO_4 (1 kg). The drying agent was removed and washed with *n*-heptane (1 L), and then the filtrate was concentrated. Isopropanol (3 L) was added to the residue and the resulting solution was concentrated. Next, the residue was dissolved in 2-propanol (4 L) and water (2 L) at 60 °C. The mixture was cooled slowly to 20 °C, and stirred at 0 °C for 5 hours. The precipitates formed were filtered and washed with cooled 2-propanol–water mixture (2 : 1, 1 L). The crystals were dried *in vacuo* at 40 °C for 20 hours to afford the titled compound (1.0 kg, 3.4 mol, 80%). Spectroscopic properties were identical with ones shown in page 80.

2-((2*S*)-2-Amino-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (79a and 79b)

2-*tert*-Butoxy-3-phenylcyclopropanone 2,2-dimethyl-1,3-propanediyl acetal (**81**) (9.1g, 31.4 mmol) was dissolved in THF (90 mL), and TMEDA (9.4 mL, 62.8 mmol) was added. Then the resulting solution was cooled to −60 °C, and *n*-BuLi (1.61 M solution in *n*-hexane, 38.9 mL, 62.6 mmol) was added. After stirring 2.5 hours at that temperature, (*S*)-*N*-*tert*-butoxycarbonylvalinal (**77**) (3.0 g, 14.9 mmol) in THF (30 mL) was added for 10 minutes, and the resulting mixture was stirred at −65 °C for 3 hours. The reaction mixture was quenched by the addition of water (4.2 mL) in THF (17.6 mL) at −65 °C, and the temperature of it was raised to 10 °C. After the resulting solution was dried over anhydrous Na_2SO_4 (4.0 g), the resulting suspension was filtered by a pad of Celite and washed with

ethyl acetate (20 mL). The solvent was evaporated to afford the crude mixture. Next, the above crude mixture was dissolved in ethyl acetate (140 mL), and the solution was washed subsequently with 0.5 M HCl solution (100 mL) twice and then saturated NaCl solution (100 mL). After the organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 (8.0 g), removal of the solvent gave an oily residue, and was dissolved in 4 M HCl solution in ethyl acetate (32 mL). The resulting mixture was stirred for 2 hours at room temperature and then 2 hours at 5 °C. The formed precipitates were filtered and washed with ethyl acetate (50 mL) to afford a mixture of **79a** and **79b** in 67 : 33 ratio (3.3 g, 12.3 mmol, 83% from **77**, 39% from **81**). Spectroscopic properties were identical with ones shown in page 59.

2-((1*S*,2*S*)-2-((*S*)-2-*tert*-Buthoxycarbonylamino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbut yl)-3-phenyl-cyclopropenone (57a)

To a solution of Boc-leucine hydrate (**111**) (27.5 g, 110 mmol) in CH_2Cl_2 (540 mL), were added triethylamine (15.4 mL, 111 mmol) and isobutyl chloroformate (13.0 g, 98.7 mmol) at −5 °C, and the resulting mixture was stirred at that temperature for an hour. Then a mixture of the amine **79a** and **79b** in 67 : 33 ratio (24.6 g, 92.0 mmol) and triethylamine (16.6 mL, 119 mmol) were added, and the reaction mixture was stirred at 0 °C for 3 hours. After adding 0.1 M HCl solution (400 mL), the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (400 mL). The combined extracts were washed successively with water (400 mL), mixture of saturated $NaHCO_3$ solution and saturated NaCl solution (1 : 4, 400 mL), and dried over $MgSO_4$ (60 g). Then the drying agent was removed and washed with CH_2Cl_2 (50 mL). After removal of the solvent, ethyl acetate (500 mL) was added and the solvent was evaporated. This process was repeated one more time. After adding ethyl acetate (400 mL) to the resideue, the mixture was stirred for 4.5 hours at room temperature and then for 1.5 hours at 5 °C. The precipitates were filtered and washed with cooled ethyl acetate (60 mL). Compound **57b** was obtained as crystals (11.3 g, 25.4 mmol, 28%, *S* : *R* = 2 : 98). After filtrate was

concentrated, *i*-Pr_2O (400 mL) was added and the solvent was evaporated again. Then *t*-BuOMe (86 mL) was added to the residue and the solution was stirred for an hour at room temperature. To the mixture, *i*-Pr_2O (259 mL) was added and the resulting solution was stirred for 2 hours at room temperature, and then for 2 hours at 5 °C. The precipitates were filtered and washed with cooled mixture of *i*-Pr_2O–*t*-BuOMe (3 : 1, 60 mL). The crystals were dried *in vacuo* to afford the titled compound (20.9g, 47.0 mmol, 51%, *S* : *R* = 97 : 3). Spectroscopic properties were identical with ones shown in page 69.

2-((1*S*, 2*S*)-2-((*S*)-2-Amino-4-methylvalerylamino)-1-hydroxy-3-methylbutyl)-3-phenylcyclopropenone hydrochloride (58a)

Compound **57a** (39.7 g, 89.3 mmol) was dissolved in ethanol (200 mL) and the solution was cooled to 0 °C. Then, concentrated HCl (100 mL) was added, and the resulting mixture was stirred at room temperature for an hour. The reaction mixture was concentrated *in vacuo*. After dried *in vacuo* at room temperature, Et_2O (350 mL) was added and the resulting suspension was stirred for an hour. The precipitates were filtered and washed with Et_2O (20 mL), and then dried *in vacuo* at room temperature for 8 hours to afford the titled compound (34.0 g, 89.4 mmol, quant.). Spectroscopic properties were identical with ones shown in page 70.

2-((1*S*, 2*S*)-1-Hydroxy-3-methyl-2-((*S*)-4-methyl-2-phenylsulfonylaminovalerylamino)butyl)-3-phenylcyclopropenone (2a)

To a solution of **58a** (20.0 g, 52.6 mmol) and benzenesulfonyl chloride (9.8 g, 56 mmol) in CH_2Cl_2 (400 mL), triethylamine (10.6 g, 76.2 mmol) was added at 0 °C, and the resulting mixture was stirred at room temperature for 2 hours. After adding 0.1 M HCl solution (300 mL), the aqueous layer was extracted with CH_2Cl_2 (600 mL). The combined extracts were successively washed with water (300 mL), saturated $NaHCO_3$ solution (150 mL), and saturated NaCl solution (150 mL), and

dried over $MgSO_4$. The drying agent was removed and washed with CH_2Cl_2 (30 mL), and then the filtrate was evaporated to give crude solids, which was dissolved in CH_2Cl_2 (250 mL). After resulting solution was cooled to 0 °C, the mixture was stirred for an hour at that temperature. The precipitates were filtered and dried *in vacuo* at 30 °C for 10 hours to afford the titled compound (22.3 g). The filtrate was evaporated and dissolved in CH_2Cl_2 (30 mL). After stirring for an hour at 0 °C, the precipitates were filtrated and washed with CH_2Cl_2 (5 mL). The crystals were dried *in vacuo* to afford the titled compound (1.6 g). Totally, 23.9g (49.3 mmol, 94%) of the titled compound was obtained. Spectroscopic properties were identical with ones shown in page 70.

参考文献

1. Thomson Reuters Integrity のデータベース検索を実施
2. 村地孝　プロテアーゼ研究の焦点と将来.　最新医学　**1988**, *43*, 820–3.
3. 徳永文稔; 岩永貞昭　プロテアーゼの分類と一般的性状.　最新医学　**1988**, *43*, 698–703.
4. Wang, K. K. W.; Yuen, P.-W. Development and Therapeutic Potential of Calpain Inhibitors. *Adv. Pharmacol*. **1997**, *37*, 117–52.
5. Pietras, R. J.; Roberts, J. A. Distribution of Cathepsins B and H on Rat Tissues and Peripheral Blood Cells. *J. Biochem.* **1985**, *98*, 87–93.
6. Kominami, E.; Tsukahara, T.; Bando, Y.; Katsunuma, N. Cathepsin B-like enzymes. Subcellular distribution and properties in neoplastic and control cells from human ectocervix. *J. Biol. Chem*. **1984**, *256*, 8536–44.
7. Woo, J. T.; Yamaguchi, K.; Hayama, T.; Kobori, T.; Sigeizumi, S.; Sugimoto, K. Kondo, K.; Tsuji, T.; Ohba, Y.; Tagami, K.; Sumitani, K. Suppressive effect of *N*-(benzyloxycarbonyl)-$_{L}$-phenylalanyl-$_{L}$-tyrosinal on bone resorption *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol.* **1996**, *300*, 131–5.
8. Miura, M.; Zhu, H.; Retello, R.; Hartwieg, E. A.; Yuan, J. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1β-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene ced-3. *Cell* **1993**, *75*, 653–60.
9. 鈴木紘一　カルシウム依存性プロテアーゼ研究の動向第１回.　細胞工学　**1991**, *10*, 545–51.
10. 鈴木紘一　カルシウム依存性プロテアーゼ研究の動向第２回.　細胞工学　**1991**, *10*, 719–27.
11. 鈴木紘一　カルシウム依存性プロテアーゼ研究の動向第３回.　細胞工学　**1991**, *10*, 878–85.

12. Wang, K. K. W.; Yuen, P.-W. Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends in Pharmaceutical Science* **1994**, 412–9.

13. Hayes, R. L.; Wang, K. K. W.; Kampfl A.; Posmantur R. M.; Newcomb J. K.; Clifton G.L. Potential Contribution of Proteases to Neuronal Damage. *Drug News Perspect* **1998**, *11*, 215–222.

14. Yuen, P.-W.; Wang, K. K. W. Therapeutic potential of calpain inhibitors in neurodegenerative disorders. *Exp. Opin. Ivest. Drugs* **1996**, *5*, 1291–1304.

15. 安藤亮一; 榊敏朗; 増田裕和 含酸素複素環誘導体, 特開平 9–169752.

16. Arigoni, E.; Cohadon, F. Calcium-activated neutral protease activities in brain trauma. *Neurochemical Research* **1991**, *16*, 483–7.

17. Iizuka, H; Iwasaki, Y.; Yamamoto, T.; Kadoya S. Morphometric assessment of drug effects in experimental spinal cord injury. *Journal of Neurosurgery* **1986**, *65*, 92–98.

18. Selkoe, D. J. Amyloid Protein and Alzheimer's Disease. *Scientific American* **1991**, *11*, 40–47.

19. McCord, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *New England Journal of Medicine* **1985**, *312*, 159–63.

20. 豊岡照彦 心筋梗塞とプロテアーゼとの関連. 最新医学 **1988**, *43*, 783–9.

21. Toyo-oka, T.; Kamishiro, T.; Hara, K.; Nakamura, N.; Kitahara, M.; Msasaki, T. Suppression of Myocardial Protein Degradation by the Protease Inhibitor Bis[ethyl(2*R*,3*R*)-3-[(*S*)-methyl-1-[4-(2,3,4-trimethoxyphenyl-methyl)piperazin-1-ylcarbonyl] butylcarbonyl]oxiran-2-carboxylate]sulfate under Hypoxia. *Arzneimittel Forschung/Drug Research* **1986**, *36*, 190–3.

22. Toyo-oka, T.; Kamishiro, T.; Gotoh, Y.; Fumino, H.; Msasaki, T.; Hosoda, S. Temporary Salvage of Ischemic Myocardium by the Protease Inhibitor Bis[ethyl(2*R*, 3*R*)-3-[(*S*)-methyl-1-[4-(2,3,4-trimethoxyphenyl-methyl)piperazin-1-ylcarbonyl]butylcarbonyl] oxiran-2-carboxylate]sulfate. *Arzneimittel Forschung / Drug Research* **1986**, *36*, 671–5.

23. Inuzuka, T.; Tamura, A.; Sato, S.; Kirino, T.; Toyoshima, I.; Miyataka, T. Suppressive effect of E-64c in ischemic degradation of cerebral proteins following occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Brain Research* **1990**, *526*, 177–9.

24. 石浦章一; 鈴木紘一 カルシウム依存性プロテアーゼ異常による筋疾患. 代謝・臨時増刊号「代謝病ハイライト」**1988**, *25*, 183–186.

25. Tamai, A.; Omura, S.; Kimura, M.; Hanada, K.; Sugita, H. Prolongation of life span of dystrophic hamster by cysteine proteinase inhibitor, loxistatin (est). *Journal of Pharmacobio Dynamics* **1997**, *10*, 678–81.

26. Hightower, K. R.; David, L. L.; Shearer, T. R. Regional distribution of free calcium in selenite cataract: relation to calpain II. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **1987**, *28*, 1702–6.

27. Hightower, K. R.; Reddy, V. N. Calcium content and distribution in human cataract. *Experimental Eye Research* **1982**, *34*, 413–21.

28. David, L. L.; Shearer, T. R. Role of Proteolysis in Lenses: A Review. *Lens and Eye Toxicity Research* **1989**, 6, 725–47.

29. Shearer, M.; Azuma, T. R.; David, L. L.; Murachi, T. Amelioration of cataracts and proteolysis in cultured lenses by cysteine protease inhibitor E64. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **1991**, *32*, 533–40.

30. Kerlero, de Rosbo N.; Carnegie, P. R.; Bernard, C. C. A. Quantitative Electroimmunoblotting Study of the Calcium-Activated Neutral Protease in Human Myelin. *Journal of Neurochemistry* **1986**, *47*, 1007–12.

31. 神奈木玲児; 村地孝 カルパイン・カルパスタチン系の生理学的意義. 蛋白核酸酵素 **1987**, *32*, 116–29.

32. 南康文 情報伝達とカルシウムプロテアーゼ. 最新医学 **1988**, *43*, 725–9.

33. Battaglia, F.; Trinchese, F.; Liu, S.; Walter, S.; Nixon, R. A.; Arancio, O. Calpain Inhibitors, a Treatment for Alzheimer's Disease. *Journal of Molecular Neuroscience* **2003**, *20*, 357–362.

34. Nixon, R. A.; Saito, K. I.; Grynspan, F. R.; Griffin, W. R.; Katayama, S.; Honda, T.; Mohan, P. S.; Shea, T. B.; Beermann, M. Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann NY Acad Sci.* **1994**, *747*, 77–91.

35. Lopes, J. P.; Agostinho, P. Cdk5: Multitasking between physiological and pathological conditions. *Progress in Neurobiology* **2011**, *94*, 49–63.

36. Isaka, M.; Matsuzawa, S.; Yamago, S.; Ejiri, S.; Miyachi, Y.; Nakamura, E. Applications of Metalated Cyclopropenone Ketals in a General Synthesis of Cyclopropenones. An Efficient Synthesis of the Antibiotic Penitricin. *J. Org. Chem*. **1989**, *54*, 4727–9.

37. Isaka, M.; Ejiri, S.; Nakamura, E. General synthesis of cyclopropenones and their acetals. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 2045–2057.

38. Tokuyama, H.; Isaka, M.; Nakamura, E.; Ando, R.; Morinaka, Y. Synthesis and biological activities of cyclopropenone antibiotic penitricin and congeners. *J. Antibiotics* **1992**, *45*, 1148–1154.

39. Nakamura, M.; Isobe, H.; Nakamura, E. Cyclopropenone Acetals – Synthesis and Reactions. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1295–326.

40. Isaka, M.; Ando, R.; Morinaka, Y.; Nakamura, E. One-pot synthesis of substituted cyclopropenone ketals via alkylation of 3,3-dialkoxy-2-sodiocyclopropenes. *Tetrahedron Lett*. **1991**, *32*, 1339–42.

41. 明日の新薬 Web・テクノミック(株)製作

42. Nishimura, T.; Goll, D. E. Binding of calpain fragments to calpastatin. *J. Biol. Chem*. **1991**, *266*, 11, 842–50.

43. Toyo-Oka, T.; Shimizu, T.; Masaki, T. Inhibition of proteolytic activity of calcium activated neutral protease by leupeptin and antipain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1978**, *82*, 484–91.

44. Mehdi, S. Cell-penetrating inhibitors of calpain. *Trends Biochem Sci*. **1991**, *16*, 150–3.

45. Umezawa, S; Tatsuta, K; Fujimoto, K; Tsuchiya, T; Umezawa, H. Structure of antipain, a new Sakaguchi-positive product of streptomyces. *J. Antibiotics* **1972**, *25*, 267–70.

46. Saito, M.; Kawaguchi, N.; Hashimoto, M.; Kodama, T.; Higuchi, N.; Tanaka, T.; Nomoto, K.; Murachi, T. Purification and Structure of Novel Cysteine Proteinase Inhibitors, Staccopins P1 and P2, from Staphylococcus Tanabeensis. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 861–8.

47. Sasaki, T.; Kishi, M.; Saito, M.; Tanaka, T.; Higuchi, N.; Kominami, E.; Katsunuma, M.; Murachi, T. Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *J. Enz. Inhib*. **1990**, *3*, 195–201.

48. Yano, Y.; Shiba, E.; Kambayshi, J.; Sakon, M.; Kawasaki, T.; Fujitani, K.; Kang, J.; Mori, T. The effects of calpeptin (a calpain specific inhibitor) on agonist-induced microparticle formation from the platelet plasma membrane. *Thromb. Res*. **1993**, *71*, 385–96.

49. Shaw, E. Cysteinyl proteinase and their selective inactivation. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol*. **1990**, *63*, 271–347.

50. Soni, S.; Dhawana, S.; Rosenb, K. M.; Chafelc, M.; Chishtid, A. H.; Hanspala, M. Characterization of events preceding the release of malaria parasite from the host red blood cell. *Blood Cells Mol .Dis*. **2005**. *35,* 201–11.

51. Li, Z.; Patil, G. S.; Golubski, Z. E.; Hori, H.; Tehrani, K.; Foreman, J. E.; Eveleth, D. D.; Bartus, R. T.; Powers, J. C. Peptide α-keto ester, α-keto amide, and α-keto acid inhibitors of calpains and other cysteine proteases. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 3472–80.

52. Bartus, R. T.; Baker, K. L.; Heiser, A. D.; Sawyer, S. D.; Dean, R. L.; Elliott, P. J.; Straub, J. A. Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. **1994**, *14*, 537–44.

53. Bartus, R. T.; Hayward, N. J.; Elliott, P. J.; Sawyer, S. D.; Baker, K. L.; Dean, R. L.; Akiyama, A.; Straub, J. A.; Harbeson, S. L.; Li, Z.; Powers, J. Calpain inhibitor AK295 protects neurons

from focal brain ischemia. Effects of postocclusion intra-arterial administration. *Stroke* **1994**, ***25***, 2265–70.

54. Alvarez, M. E.; Houck, D. R.; White, C. B.; Brownell, J. E.; Bobko, M. A.; Rodger, C. A.; Stawicki, M. B.; Sun, H. H.;Grillum, A. M.; Cooper, R. Isolation and structure elucidation of two new calpain inhibitors from *Streptomyces griseus*. *J. Antibiotics* **1994**, ***47***, 1195–201.
55. Azuma, M.; David, L. L.; Shearer, T. R. Superior prevention of calcium ionophore cataract by E64d. *Biochim. Biophys. Acta.* **1992**, *1180*, 215–20.
56. Shoji-Kasai, Y.; Sensyu, M.; Iwashita, S.; Imahori, K. Thiol protease-specific inhibitor E–64 arrests human epidermoid carcinoma A431 cells at mitotic metaphase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 146–50.
57. Chatterjee, S.; Josef, K.; Wells, G.; Iqbal, M.; Bihovsky, R.; Mallamo, J. P.; Ator, M. A.; Bozyczko-Coyne, D.; Mallya, S.; Senadhi, S.; Siman, R. Potent fluoromethyl ketone inhibitors of recombinant human calpain I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1237–40.
58. Ahmed, N. K.; Martin, L. A.; Watts, L. M.; Palmer, J.; Thornburg, L.; Prior, J.; Esser, R. E. Peptidyl fluoromethyl ketones as inhibitors of cathepsin B. Implication for treatment of rheumatoid arthritis. *Biochemical Pharmacology* **1992**, *44*, 1201–7.
59. Matsueda, R.; Umeyama, H.; Puri, R. N.; Bradford, H. N.; Colman, R. W. Potent affinity labeling peptide inhibitors of calpain. *Chem. Lett.* **1990**, 191–4.
60. Harris, A. L.; Gregory, J. S.; Maycock, A. L.; Graybill, T. L.; Osifo, I. K.; Schmidt, S. J.; Dolle, R. E. Characterization of a continuous fluorogenic assay for calpain I. Kinetic evaluation of peptide aldehydes, halomethyl ketones and (acyloxy)methyl ketones as inhibitors of the enzyme. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 393–8.
61. Graybill, T. L.; Dolle, R. E.; Osifo, I. K.; Schmidt, S.; Gregory, J. S.; Harris, A. L.; Miller, M. S. Inhibition of human erythrocyte calpain I by novel quinolinecarboxamides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1995**, *5*, 387–92.

62. Wang, K. K.; Nath, R.; Posner, A.; Raser, K. J.; B.-Kilgore, M.; Hajimohammadreza, I.; Probert, A. W. Jr.; Marcoux, F. W.; Ye, Q.; Takano, E.; Hatanaka, M.; Maki, M.; Caner, H.; Collins, J.L.; Fergus, A.; Lee, K. S.; Lunney, E. A.; Hays, S. J.; Yuen, P. An alpha-mercaptoacrylic acid derivative is a selective nonpeptide cell-permeable calpain inhibitor and is neuroprotective. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, *93*, 6687–92.

63. Omura, S.; Tanaka, H.; Shimoi, K.; Liu, J. R. Pyrrole propionic acid amide (cystamidine A) manufacture with Streptomyces, and its use as calpain inhibitor. *Eur. Pat. Appl. EP 569122 A1* **1993**.

64. Otto, H.-H.; Schirmeister, T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 133–72.

65. Potts, K. T.; Baum, J. S. The Chemistry of Cyclopropenones. *Chem. Rev.* **1974**, *74*, 189–213.

66. Komatsu, K.; Arai, M.; Hattori, Y.; Fukuyama, K.; Katsube, Y.; Okamoto, K. Reaction of 1,8-Bis(phenylethynyl)naphthalene with Phenylchlorocarbene: Formation of an Intramolecular Cyclization Product from the Carbene Monoadduct and of 1,8-Naphthylenebis(diphenylcyclopropenyliurn) Dication from the Bisadduct. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2183–92.

67. Dehmlow, E. V. Cyclopropenonchemie III. Die reaction zwischen diphenylcyclopropenon und a ziridin (1). *Tetrahedron Lett.* **1967**, *51*, 5177–9.

68. Ciabattoni, J.; Kocienski, P. J.; Melloni, G. Conjugate addition of organolithium reagents to diphenylcyclopropenone. *Tetrahedron Lett.* **1969**, *23*, 1883–7.

69. Okuda, T.; Shimma, N.; Furumai, T. Penitricin, a new class of antibiotic produced by *Penicillium aculeatum* III. Structural confirmation by chemical synthesis and biological activity. *J. Antibiot.* **1984**, *37*, 723–7.

70. Kogen, H.; Kiho, T.; Tago, K.; Miyamoto, S.; Fujioka, T.; Otsuka, N.; Suzuki-Konagai, K.; Ogita, T. Alutacenoic Acids A and B, Rare Naturally Occurring Cyclopropenone Derivatives

Isolated from Fungi: Potent Non-Peptide Factor XIIIa Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1842–3.

71. Schechter, I.; Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *27*, 157–62.

72. Wang, K. K. W. Developing selective inhibitors of calpain. *Trends Pharmacol. Sci.* **1990**, *11*, 139.

73. Moldoveanu, T.; Campbell, R. L.; Cuerrier, D.; Davies, P. L. Crystal Structures of Calpain–E64 and –Leupeptin Inhibitor Complexes Reveal Mobile Loops Gating the Active Site. *J. Mol. Biol.* **2004**, *343*, 1313–26.

74. Li, Q.; Hanzlik, R. P.; Weaver, R. F.; Schönbrunn, E. Molecular Mode of Action of a Covalently Inhibiting Peptidomimetic on the Human Clpina Protease Core. *Biochemistry* **2006**, *45*, 701–8.

75. Tokuyama, H.; Isaka, M.; Nakamura, E. Synthesis of Cyclopropenone-Containing Amino Acid Mimic. Addition of Cyclopropenyl Cerium Reagent to α-Amino Aldehydes. *Synth. Commun.* **1995**, *25*, 2005–12.

76. Ando, R.; Morinaka, Y.; Tokuyama, H.; Isaka, M.; Nakamura, E. A New Class of Proteinase Inhibitor. Cyclopropenone - Containing Inhibitor of Papain. *J. Amer. Chem. Soc*. **1993**, *115*, 1174–5.

77. Imamoto, T.; Sugiura, Y.; Takiyama, N. Organocerium reagents. Nucleophilic addition to easily enolizable ketones. *Tetrahedron Lett*. **1984**, *25*, 4233–6.

78. Breslow, R.; Höver, H.; Chang, H. W. The Synthesis and Stability of Some Cyclopropenyl Cations with Alkyl Substituents. *J. Amer. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 3168–74.

79. Breslow, R.; Altman, L. J.; Krebs, A.; Mohacsi, E.; Murata, I.; Peterson R.A.; Posner J. Substituted Cyclopropenones. *J. Amer. Chem. Soc.* **1965**, *87*, 1326–31.

80. Ammon, H. L. Structures of, and charge separation in, 2,3-diphenyl-4,4-dicyanotriafulvene and 2,3-diphenylcyclopropenone. *J. Amer. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 7093–101.

81. Tsukada, H.; Shimanouchi, H.; Sasada, Y. X-ray determination of the structure of anhydrous diphenylcyclopropenone. Variation of the molecular geometry due to hydrogenbonding. *Chem. Lett.* **1974**, 639–42.

82. Peters, K.; G. von Schnering, H. Crystal Structure of Bis(*p*-chlorophenyl)cyclopropenone - a Correction. *Chem. Ber.* **1985**, *118*, 2147–49.

83. Barrett, A. J.; Kembhavi, A. A.; Brown, M. A.; Kirschke, H.; Knight, C. G.; Tamai, M.; Hanada, K. $_{L}$-*trans*-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E–64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189–98.

84. Kikumoto, R.; Tamao, Y.; Tezuka, T.; Tonomura, S.; Hara, H.; Ninomiya, K.; Hijikata, A.; Okamoto, S. Selective inhibition of thrombin by (2*R*,4*R*)-4-methyl-1-[N^2-[1,2,3,4-tetrahydro-8-quinolinyl)sulfonyl]-$_{L}$-arginyl]-2-piperidinecarboxylic acid. *Biochemistry* **1984**, *23*, 85–90.

85. Mehdi, S.; Angelastro, M. R.; Burkhart, J. P.; Koehl, J. R.; Peet, N. P.; Bey, P. The inhibition of human neutrophil elastase and cathepsin G by peptidyl 1,2-dicarbonyl derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **1990**, *166*, 595–600.

86. Schwabe, C. A fluorescent assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem*. **1973**, *53*, 484–490.

87. 安藤亮一; 盛中泰洋; 高橋千寿子 シクロプロパン誘導体. 特開平 5-230004.

88. Trinchese, F.; Fa', M.; Liu, S.; Zhang, H.; Hidalgo, A.; Schmidt, S. D.; Yamaguchi, H.; Yoshii, N.; Mathews, P. M.; Nixon, R. A.; Arancio, O. Inhibition of calpains improves memory and synaptic transmission in a mouse model of Alzheimer disease. *J. Clin. Inves*. **2008**, *118*, 2796–807.

89. Li, X.; Chen, H.; Jeong, J.-J.; Chishti, A. H. BDA–410: A novel synthetic calpain inhibitor active against blood stage malaria. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2007**, *155*, 26–32.

90. 大平充宣; 河野史倫; 吉井成彦 筋衛星細胞賦活薬. WO2006 / 078056.

91. Sasaki, T.; Kikuchi, T.; Yumoto, N.; Yoshimura, N.; Murachi, T. Comparative specificity and kinetic studies on porcine calpain I and calpain II with naturally occurring peptides and synthetic fluorogenic substrates. *J. Biol. Chem*. **1984**, *259*, 12489–94.

92. Sasaki, T.; Kikuchi, T.; Fukui, I.; Murachi, T. Inactivation of calpain I and calpain II by specificity-oriented tripeptidyl chloromethyl ketones. *J. Biochem*. **1986**, *99*, 173–9.

93. Varughese, K. I.; Ahmed, F. R.; Carey, P. R.; Hasnain, S.; Huber, C. P.; Storer, A. C. Crystal structure of a papain–E-64 complex. *Biochemistry* **1989**, *28*, 1330–2.

94. 川島誠一; 西道隆臣 カルパインの生理学的機能. 蛋白核酸酵素 **1992**, *37*, 2144–60.

95. Yoshii, N.; Ohgami, T.; Yamaguchi, N.; Ando, R.; Saito, K. Neuroprotective effect of a novel orally active reversible calpain inhibitor BDA–410. the Society for Neuroscience 29th Annual Meeting, p.344, Miami Beach (U.S.A.), October, **1999**.

96. Jurczak, J.; Golebiowski, A. Optical Active *N*-Protected α-Amino Aldehydes in Organic Synthesis. *Chemical Reviews* **1989**, *89*, 149–64.

97. Holladay, M. W.; Rich, D. H. Synthesis of hydroxyethylene and ketomethylene dipeptide isosters. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4401–04.

98. Reetz, M. R.; Drewer, M. W.; Schmitz, A. Stereoselective Synthesis of β-Amino Alcohols from Optically Active α-Amino Acids. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1987**, *26*, 1141–3.

99. Reetz, M. T.; Drewes, M. W.; Harms, K.; Reif, W. Stereoselective Cyanohydrin-Forming Reactions of Chiral α-Amino Aldehydes, *Tetrahedron Lett.*, **1988**, *29*, 3295–8.

100. Reets, M. T. New Approaches to the Use of Amino Acids as Chiral Building Blocks in Organic Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **1991**, *30*, 1531–750.

101. Kiyooka, S.; Nakano, M.; Shiota, F.; Fujiyama, R. Dramatic changes in diastereoselectivity with the quantity of titanium tetrachloride used in Lewis acid mediated reactions of allylsilane with α-amino aldehydes. *J. Org. Chem*. **1989**, *54*, 5409–11.

102. DeCamp, A. E.; Kawaguchi, A. T.; Volante, R. P.; Shinkai, I. Stereocontrolled Addition of Propionate Homoenolate Equivalents to Chiral α-Amino Aldehydes. *Tetrahedron Lett*. **1991**, *32*, 1867–70.

103. Hanson, G. H.; Lindberg, T. Synthesis of new dipeptide analogs containing novel ketovinyl and hydroxyethylidene isosteres via Grignard addition to chiral α-amino aldehydes. *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5399–401.

104. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS, " Partition Coefficient (*n*-octanol / water), High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Method", Adopted by the Council on 30th March 1989.

105. Inoue, M.; Kishimoto, A. Takai, Y, Nishizuka, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian issues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 7610–7616.

106. Bando, Y.; Kominami, E.; Katunuma, N. Purification and tissue distribution of rat cathepsin L. *J Biochem.* **1986**, *100*, 35–42.

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学大学院理学系研究科・中村栄一教授、東北大学大学院薬学研究科・徳山英利教授、田辺三菱製薬株式会社・安藤亮一博士に深甚なる謝意を申し上げます。

並びに、有益なるご助言、ご討論を賜りました共同研究者である伊坂雅彦博士、片山創太氏、斎藤健一博士、直原哲夫氏、白坂正博士、玉尾嘉邦博士、高橋千寿子氏、増田裕和氏、故・盛中泰洋博士、吉井成彦氏に心より御礼申し上げます。また、X 線結晶構造解析を行っていただきました三菱化成株式会社（当時）の松崎尹雄博士、小佐野康子博士、小島優子博士に深く感謝いたします。

本研究の機会を与え、多大なるご便宜を賜りました田辺三菱製薬株式会社　取締役常務執行役員・子林孝司博士、執行役員・上野裕明博士に厚く御礼申し上げます。さらに、多大なるご助言、ご支援を賜りました井上直子氏、井上瑠美氏、岡本雅子博士、坂槇茂輝博士、佐々木千津子氏、高科謙博士、高嶋純子氏、中西展大氏、野村純宏博士、森智恵子氏、山口尚子氏に感謝致します。

2015 年 9 月