

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 6 月 7 日(07.06.2012)



(10) 国際公開番号

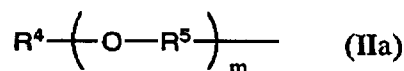
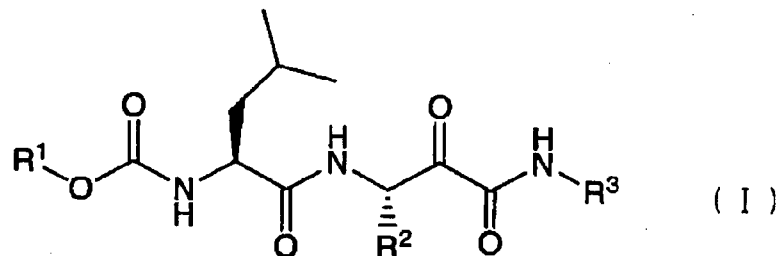
WO 2012/074120 A1

- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) A61K 31/351 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01) A61K 31/44 (2006.01)
A61K 31/27 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/341 (2006.01) C07K 5/023 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/078000
- (22) 国際出願日: 2011 年 11 月 28 日(28.11.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-264763 2010 年 11 月 29 日(29.11.2010) JP
特願 2011-220480 2011 年 10 月 4 日(04.10.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 公立
大学法人大阪市立大学(OSAKA CITY UNIVER-
SITY) [JP/JP]; 〒5588585 大阪府大阪市住吉区杉本
3 丁目 3 番 1 3 8 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 広常 真治
(HIROTSUNE, Shinji) [JP/JP]; 〒5588585 大阪府大阪
市住吉区杉本 3 丁目 3 番 1 3 8 号 公立大学法
人大阪市立大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(Sae-
gusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区
道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: LISSENCEPHALY THERAPEUTIC AGENT

(54) 発明の名称: 滑脳症治療剤



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a drug and method for the treatment of lissencephaly patients. The present invention provides a lissencephaly therapeutic or preventive agent containing a compound represented by general formula (I) (where R1 is a lower alkyl group substituted by a lower alkoxy group, a lower alkyl group substituted by a heterocyclic group, a heterocyclic group, or a group represented by formula (IIa) (where R4 is a lower alkyl group, R5 is a lower alkylene group, and m is an integer between 1 and 6); R2 is a lower alkyl group optionally substituted by a phenyl group; and R3 is a lower alkyl group (optionally substituted by a halogen, lower alkoxy group, or phenyl group), a condensed polycyclic hydrocarbon group, or a hydrogen atom).

(57) 要約: 本発明は、滑脳症患者を治療する薬剤及び方法を提供することを課題とする。本発明は、一般式 (I) [式中、R1は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式 (IIa) (式中、R4は低級アルキル基、R5は低級アルキレン基、mは1~6の整数を示す。) で示される基を示す。R2はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。R3は低級アルキル基 (ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。] で表される化合物を含有する、滑脳症治療又は予防剤を提供する。



WO 2012/074120 A1



(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明細書

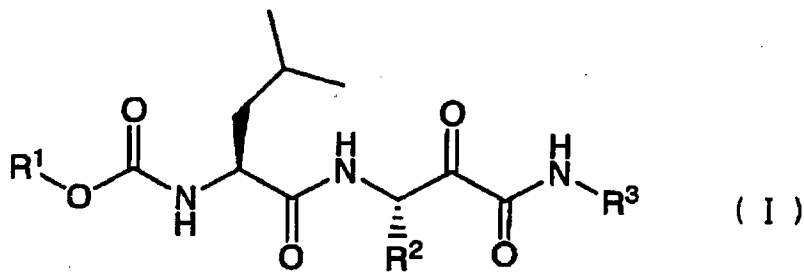
発明の名称：
滑脳症治療剤

5

技術分野

本発明は、滑脳症治療剤に関する。より詳細には、一般式 (I)

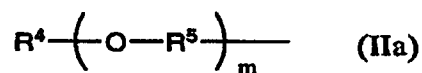
[化1]



10

[式中、 R^1 は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式 (I I a)

[化2]



15 (式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。)で示される基を示す。 R^2 はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。

R^3 は低級アルキル基 (ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。]

20 る、滑脳症治療剤に関する。

背景技術

滑脳症 (lissencephaly) は、脳の表面に脳回がなく平滑であり、神経細胞の層構造の異常を示すことを特徴とする形成不全である。滑脳症患者は、重度の精神遅滞やてんかん発作等を示し、生命予後は不良である。新生児～幼児期に死亡することが多いが5歳を超えて生存する場合も見られる。発生頻度は1万5千人に1人程度とされている。臨床的な診断はMRI又はCTによる画像診断により行われる。専門医が画像から脳回の形態の異常を読み取り、診断を行う。

滑脳症の約60%は、Pafah1b1 (LIS1) 遺伝子のヘテロ変異に伴う神経細胞の遊走異常が原因と考えられている。具体的には、LIS1タンパク質の発現量低下により、順行性の細胞質ダイニンの移動が阻害され、細胞質ダイニンが中心体に偏在することにより、神経細胞の遊走障害が引き起こされる結果、中枢神経系の層構造に異常が生じる（すなわち、滑脳症を発症する）と考えられている。

滑脳症は、治療法が存在しない難病であったが、近年、治療法の糸口となり得ると期待される画期的な報告がなされた（非特許文献1）。当該報告には、LIS1遺伝子ヘテロ変異 (Lis1+/-) の細胞を用いた実験において、カルパイン阻害剤であるALLN (CALPAIN INHIBITOR I: 構造はN-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO (Calbiochem: 208719-25MG)) で細胞を処理したところ、LIS1タンパク質発現が増加し、神経細胞の遊走も回復したことが記載されている。さらに、Lis1+/-胎児マウスを妊娠したマウスに対しALLNを腹腔内投与することにより、当該胎児マウスの脳の滑脳症の症状が改善され得る可能性が示唆されている。

しかしながら、当該報告は細胞レベル又は胎児レベルで滑脳症を改善し得る可能性を示しているだけであって、実際の臨床現場において活用するのは依然困難であった。というのも、ヒトにおいては、滑脳症は突然変異による散发例が多く、次子に遺伝する可能性がほとんどないことから、出生後に初めて滑脳症と診断されることがほとんどであり、出生後に治療を行う必要があるからである。

また、そもそもALLNは毒性が強い化合物であり、この点でも治療目的で用いることは困難であった。

このため、L i s 1 + / - の滑脳症新生児～幼児をも治療可能（つまり、出生後も治療可能）な薬剤及び方法が依然として切望されていた。

なお、上記一般式（I）で表される化合物及びその製法は、特許文献1に記載されており、当該化合物をカルパイン阻害剤として用い得ることも記載されている。

5

先行技術文献

特許文献

特許文献1：特開2006-76989号

非特許文献

- 10 非特許文献1：Masami Yamada et. al., Nature Medicine 15, 1202-1207 (2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- 15 本発明は、滑脳症患者（特に出生後の滑脳症患者）を予防又は治療する薬剤及び方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

- 20 本発明者らは、驚くべき事に、上記一般式（I）で表される化合物を投与することにより、胎児期のみならず出生後であっても滑脳症を治療し得ること、及び当該化合物は毒性も小さいこと、を見出し、さらに改良を重ねて本発明を完成させるに至った。

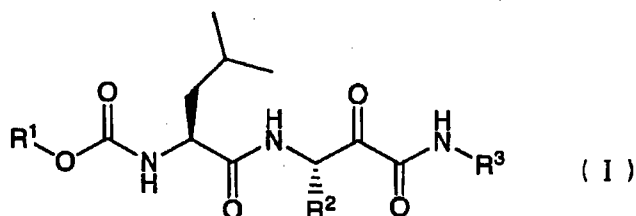
すなわち、本発明は、例えば、以下の項に記載の滑脳症治療又は予防剤等を包含する。

項A-1.

一般式（I）

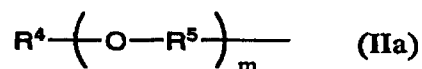
25

[化3]



[式中、 R^1 は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式 (I I a)

[化4]



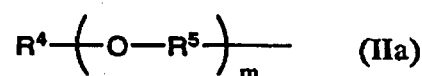
(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示

- 5 す。)で示される基を示す。 R^2 はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。 R^3 は低級アルキル基(ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。)で表される化合物を含有する、滑脳症治療又は予防剤。

項A-2.

- 10 R^1 が、式 (I I a)

[化5]

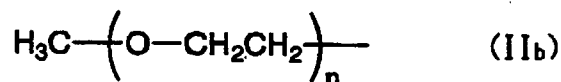


(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。)で示される基である、項A-1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

項A-3.

- 15 R^1 が、式 (I I b)

[化6]



(式中、 n は1～6の整数を示す。)で示される基である項A-1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

項A-4.

- 20 R^1 で示される低級アルキル基上に置換した複素環基が、低級アルキル基を有していてもよいピリジルである項A-1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

項A-5.

R¹で示される複素環基のヘテロ原子が酸素原子である項A-1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

項A-6.

R³で示される低級アルキル基がシクロプロピル基である項A-1～A-5のいずれかに記載の滑脳症治療又は予防剤。

項A-7.

一般式(I)で表される化合物が、

- (1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル、
- (1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル、
- ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルエステル、
- (1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルエステル、又は
- (1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(ピリジン-2-イル)エチルエステルである、

項A-1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

項A-8.

- 25 経口剤、注射剤、又は点滴剤である、項A-1～A-7のいずれかに記載の滑脳症治療又は予防剤。

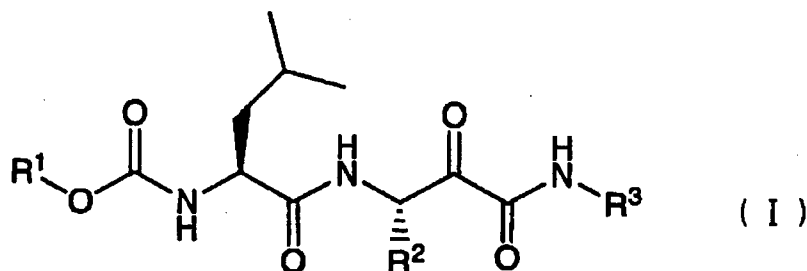
項A-9.

一般式 (I) で表される化合物約 50 ～ 約 1200 mg が、滑脳症患者又は妊婦に対して 2 ～ 5 日あたり 1 回投与されるように用いられることを特徴とする、項 A-1 ～ A-8 のいずれかに記載の滑脳症治療又は予防剤。

項 B-1.

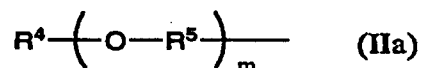
5 一般式 (I)

[化 7]



[式中、 R^1 は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式 (IIa)

10 [化 8]

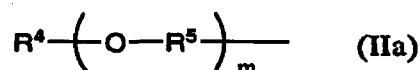


(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は 1 ～ 6 の整数を示す。) で示される基を示す。 R^2 はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。 R^3 は低級アルキル基 (ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。) で表される化合物
15 (又は当該化合物を含む医薬組成物) を、滑脳症患者又は滑脳症胎児を妊娠した妊婦へ投与する工程を含む滑脳症治療方法、あるいは、妊婦へ投与する工程を含む滑脳症予防方法。

項 B-2.

R^1 が、式 (IIa)

20 [化 9]

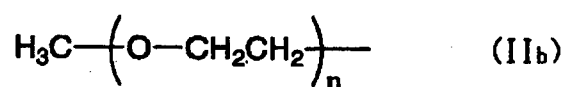


(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。)で示される基である、項B-1に記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

項B-3.

R^1 が、式 (IIb)

5 [化10]



(式中、 n は1～6の整数を示す。)で示される基である項B-1に記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

項B-4.

R^1 で示される低級アルキル基上に置換した複素環基が、低級アルキル基を有していて

10 もよいピリジルである項B-1に記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

項B-5.

R^1 で示される複素環基のヘテロ原子が酸素原子である項B-1に記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

項B-6.

15 R^3 で示される低級アルキル基がシクロプロピル基である項B-1～B-5のいずれかに記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

項B-7.

一般式 (I) で表される化合物が、

20 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル、

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル、

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルエステル、

5 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルエステル、又は

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(ピリジン-2-イル)エチルエステルである、

10 項B-1に記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

項B-8.

投与が、経口投与又は経血管投与（好ましくは経静脈投与）である、項B-1～B-7のいずれかに記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

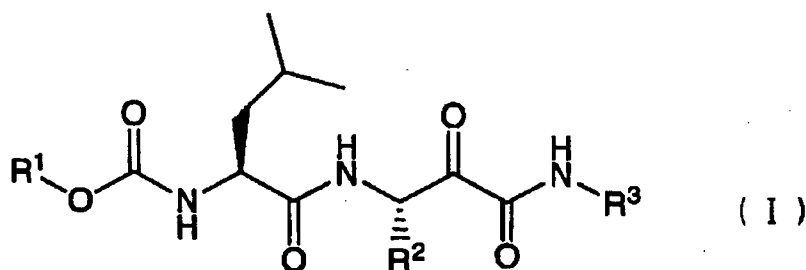
項B-9.

15 一般式(I)で表される化合物約50～約1200mgが、滑脳症患者に対して2～5日あたり1回投与されるように用いられることを特徴とする、項B-1～B-8のいずれかに記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

項C-1.

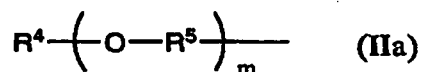
滑脳症の治療又は予防における使用のための、一般式(I)

20 [化11]



〔式中、 R^1 は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式(I Ia)

[化12]



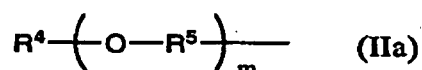
(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。)で示される基を示す。 R^2 はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。 R^3 は低級アルキル基(ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。)で表される化合物、

5 又は該化合物を含む医薬組成物。

項C-2.

R^1 が、式(IIa)

[化13]



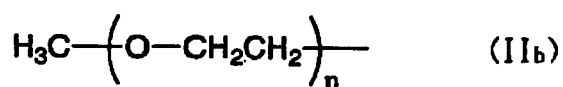
(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。)で示される基である、項C-1に記載の化合物、又は医薬組成物。

10

項C-3.

R^1 が、式(IIb)

[化14]



(式中、 n は1～6の整数を示す。)で示される基である項C-1に記載の化合物、又は

15

項C-4.

R^1 で示される低級アルキル基上に置換した複素環基が、低級アルキル基を有していてもよいピリジルである項C-1に記載の化合物、又は医薬組成物。

項C-5.

20 R^1 で示される複素環基のヘテロ原子が酸素原子である項C-1に記載の化合物、又は医薬組成物。

項C-6.

R³で示される低級アルキル基がシクロプロピル基である項C-1～C-5のいずれかに記載の化合物、又は医薬組成物。

項C-7.

一般式(I)で表される化合物が、

- 5 ((1S) -1- (((1S) -1-ベンジル-2, 3-ジオキソ-3- (シクロプロピルアミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸2-メトキシエチルエステル、
 ((1S) -1- (((1S) -1-ベンジル-2, 3-ジオキソ-3- (シクロプロピルアミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル、
- 10 ((1S) -1- (((1S) -1-ベンジル-2, 3-ジオキソ-3- (シクロプロピルアミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸8-メトキシ-3, 6-ジオキサオクチルエステル、
 ((1S) -1- (((1S) -1-ベンジル-2, 3-ジオキソ-3- (シクロプロピルアミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸11-メトキシ-3, 6, 9-トリオキサウンデカニルエステル、又は
 ((1S) -1- (((1S) -1-ベンジル-3- (シクロプロピルアミノ) -2, 3-ジオキソプロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸2- (ピリジン-2-イル) エチルエステルである、
- 15 項C-1に記載の化合物、又は医薬組成物。

項C-8.

経口投与又は経血管投与 (好ましくは経静脈投与) により投与される、項C-1～C-7のいずれかに記載の化合物、又は医薬組成物。

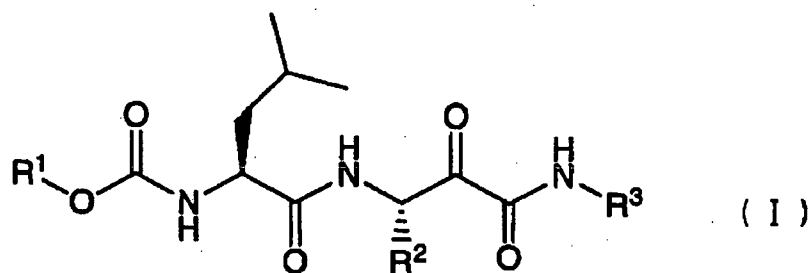
項C-9.

- 25 一般式(I)で表される化合物約50～約1200mgが、滑脳症患者又は妊婦に対して2～5日あたり1回投与されるように用いられることを特徴とする、項C-1～C-8のいずれかに記載の化合物、又は医薬組成物。

項D-1.

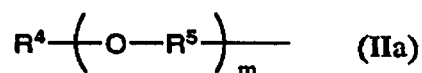
滑脳症の治療又は予防のための医薬の製造における、一般式 (I)

[化15]



[式中、 R^1 は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式 (I I a)

5 [化16]



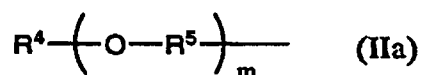
(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。) で示される基を示す。 R^2 はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。 R^3 は低級アルキル基 (ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。) で表される化合物

10 の使用。

項D-2.

R^1 が、式 (I I a)

[化17]



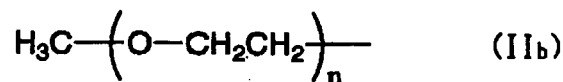
(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。) で示される基である、項D-1に記載の使用。

15

項D-3.

R^1 が、式 (I I b)

[化18]



(式中、nは1～6の整数を示す。)で示される基である項D-1に記載の使用。

項D-4.

R¹で示される低級アルキル基上に置換した複素環基が、低級アルキル基を有していてもよいピリジルである項D-1に記載の使用。

5 項D-5.

R¹で示される複素環基のヘテロ原子が酸素原子である項D-1に記載の使用。

項D-6.

R³で示される低級アルキル基がシクロプロピル基である項D-1～D-5のいずれかに記載の使用。

10 項D-7.

一般式(I)で表される化合物が、

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル、

15 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル、

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸8-

20 メトキシ-3,6-ジオキサオクチルエステル、

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルエステル、又は

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(ピリジン-2-イル)エチルエステルである、

25

項D-1に記載の使用。

項D-8.

医薬が、経口剤、注射剤、又は点滴剤である、項D-1～D-7のいずれかに記載の使用。

5 項D-9.

医薬が、一般式(I)で表される化合物約50～約1200mgが、滑脳症患者又は妊婦に対して2～5日あたり1回投与されるように用いられることを特徴とする医薬である、項D-1～D-8のいずれかに記載の使用。

10 なお、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステルは、SNJ-1945とも呼ばれる。

発明の効果

15 本発明の滑脳症治療剤を用いることにより、これまで治療が困難であった滑脳症を、母胎中の胎児のみならず、出生後であっても治療することが可能となる。具体的には、本発明の滑脳症治療剤は、母体のみならず、出生後の滑脳症患者に対して投与した場合であっても、滑脳症患者のLIS1タンパク質の減少を抑制させることができ、このために神経細胞の遊走が回復して滑脳症の症状を改善させることができる。

20 また、出生前遺伝子診断等により、LIS1遺伝子のヘテロ変異が確認され、胎児が滑脳症を発症し得る可能性が高いことが判明した場合は、母体に上記一般式(I)で表される化合物を投与することで滑脳症の発症を予防又は治療することもできる。さらに、出生前に胎児のLIS1遺伝子のヘテロ変異が確認されていなくても、また、その他滑脳症発症に関する因子の存在が確認されていなくても、子供が滑脳症を発症するのを予防するために、母体に上記一般式(I)で表される化合物を投与することもできる。つまり、上記一般式(I)で表される化合物は、胎児が滑脳症を患う可能性
25 に関係なく、滑脳症の予防のために母胎に投与して用いることもできる。

またさらに、本発明の滑脳症治療又は予防剤は、一回の投与により少なくとも3日間又はそれ以上効果が持続し得るため、投与対象（母体又は滑脳症患者）の負担を軽減することができる。このため、服薬コンプライアンスの向上も期待できる。

5 図面の簡単な説明

図1はSNJ-1945が細胞内のLISタンパク質量に与える影響を検討した結果を示す。aはウエスタンブロットにより各タンパク質を検出した図を示し、bはaで検出されたバンドの*intensity*をグラフ化した図を示す。SNJ-1945によりLISタンパク質量が回復したことがわかる。

10 図2はSNJ-1945が細胞のLISタンパク質の局在に与える影響を検討した結果を示す。SNJ-1945によりLISタンパク質の局在が回復したことがわかる。

図3はSNJ-1945が細胞の細胞質ダイニンの局在に与える影響を検討した結果を示す。SNJ-1945により細胞質ダイニンの局在が回復したことがわかる。

15 図4はSNJ-1945が細胞の細胞質 β -COPの局在に与える影響を検討した結果を示す。SNJ-1945により細胞質 β -COPの局在が回復したことがわかる。

図5はSNJ-1945が神経細胞（小脳顆粒神経細胞）の遊走能に与える影響を検討した結果を示す。aは神経細胞の凝集塊をインキュベーションしたときの細胞の遊走を蛍光顕微鏡で観察した図である。また、bは遊走した神経細胞を移動距離ごとに集計し、グラフ化した図である。SNJ-1945により神経細胞の遊走能が回復したことがわかる。

図6はSNJ-1945が胎児マウス脳のLISタンパク質量に与える影響を検討した結果を示す（ $100\mu\text{g/g}$ ：IP、胎児期E12、 $n=6$ ）。aはウエスタンブロットによりLISタンパク質を検出した図を示し、bはaで検出されたバンドの*intensity*をグラフ化した図を示す。

25 図7はSNJ-1945が新生児マウス脳のLISタンパク質量に与える影響を検討した結果を示す（ $200\mu\text{g/g}$ ：PO、新生児P1、 $n=6$ ）。aはウエスタンブロットによりLISタンパク質を検出した図を示し、bはaで検出されたバンドの*intensity*をグラフ化した図を示す。

図8はSNJ-1945が成体マウス脳のLISタンパク質量に与える影響を検討した結果を示す(100 μ g/g : IP、生後3週間、n=6)。aはウエスタンブロットによりLISタンパク質を検出した図を示し、bはaで検出されたバンドのintensityをグラフ化した図を示す。

- 5 図9はSNJ-1945が胎児マウス脳のアポトーシスに与える影響を検討した結果を示す。aはTUNNEL法による脳の染色結果図を示す。bはaにおいて染色された細胞数を集計し、染色された細胞の割合を算出してグラフ化した図を示す。

- 10 図10はSNJ-1945投与により滑脳症モデルマウスの運動学習能力が改善するかを、ロータローッドテストにより検討した結果を示す。具体的には、各群のマウスがロータローッドテストの試行を繰り返すにつれ、滞在時間がどのように変化したかを示すグラフを示す。

図11はSNJ-1945投与により滑脳症モデルマウスの運動学習能力が改善するかを、ロータローッドテストにより検討した結果を示す。具体的には、各群のマウスの合計滞在時間を比較したグラフを示す。

- 15 図12はSNJ-1945投与により滑脳症モデルマウスの運動機能が改善するかを、Gait Analysisにより検討し、%Swingについて評価した結果を示す。

- 20 図13はSNJ-1945投与により滑脳症モデルマウスの運動機能が改善するかを、Gait Analysisにより検討し、Swing-to-stance-ratioについて評価した結果を示す。

図14はヒト滑脳症患者の遺伝子診断結果(塩基配列の変化)を示す。

図15は正常ヒト線維芽細胞及びヒト滑脳症患者由来線維芽細胞におけるLIS1を、蛍光免疫染色により検出した結果を示す。

- 25 図16は、図15の結果を基に、核辺縁部から細胞の辺縁部まで等間隔で直線状に10点の蛍光強度を測定し、LIS1の細胞内局在を解析した結果を示す。

図17は正常ヒト線維芽細胞及びヒト滑脳症患者由来線維芽細胞における細胞質ダイニンを、蛍光免疫染色により検出した結果を示す。

図18は、図17の結果を基に、核辺縁部から細胞の辺縁部まで等間隔で直線状に10点の蛍光強度を測定し、細胞質ダイニンの細胞内局在を解析した結果を示す。

図19は正常ヒト線維芽細胞及びヒト滑脳症患者由来線維芽細胞における β -COP小胞を、蛍光免疫染色により検出した結果を示す。

- 5 図20は、図19の結果を基に、核辺縁部から細胞の辺縁部まで等間隔で直線状に10点の蛍光強度を測定し、 β -COP小胞の細胞内局在を解析した結果を示す。

図21は正常ヒト線維芽細胞及びヒト滑脳症患者由来線維芽細胞内のLIS1、細胞質ダイニン、及び β -actinを、ウエスタンブロットにより検出した図を示す。

図22は図21で検出したバンドのintensityをグラフ化した図を示す。

- 10 図23はSNJ-1945以外のカルパイン阻害剤を滑脳症モデルマウスに投与した際に、LIS1タンパク質発現量が回復するかを検討した結果を示す。(a) ウエスタンブロットの結果を示す。(b) ウエスタンブロットにより検出したバンドのintensityをグラフ化した図を示す。

- 15 図24はSNJ-1945、E64d、及びALLNの各カルパイン阻害剤の細胞毒性を検討した結果を示す。

発明を実施するための形態

以下、本発明について、さらに詳細に説明する。

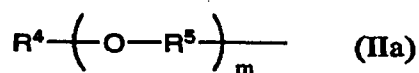
- 上記一般式(I)中、 R^1 は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、又は
 20 複素環基で置換された低級アルキル基であり得る。つまり、 R^1 は、低級アルキル基を示し得、ここで当該低級アルキル基は低級アルコキシ基又は複素環基で置換されている。
 当該低級アルキル基としては、炭素数1~6(1、2、3、4、5又は6)の直鎖状又は分枝状アルキル基が好ましく、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、
 25 ネオペンチル、tert-ペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、1,2-ジメチルプロピル、ヘキシル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1,1-ジメチルブチル、1,2-ジメチルブチル、1,3-ジメチルブチル、2,2-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチル、3,3-

ージメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル、1-エチル-2-メチルブ
ロピル又は1, 1, 2-トリメチルプロピル等が例示できる。より好ましくは炭素数2
又は3の直鎖状又は分枝状アルキル基である。とりわけエチルが好ましい。

R¹で示される低級アルキル基上に置換する低級アルコキシ基としては、炭素数1～
5 6 (1、2、3、4、5又は6)の低級アルコキシ基が好ましい。すなわち、R¹で示
される、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基としては、炭素数1～6の低級
アルコキシ基で置換された低級アルキル基が好ましい。当該炭素数1～6の低級アルコ
キシ基としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソ
ブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペンチルオキシ、イソペンチルオ
10 キシ、ネオペンチルオキシ、tert-ペンチルオキシ、1-メチルブトキシ、2-メ
チルブトキシ、1, 2-ジメチルプロポキシ、ヘキシルオキシ、1-メチルペンチルオ
キシ、2-メチルペンチルオキシ、3-メチルペンチルオキシ、4-メチルペンチルオ
キシ、1, 1-ジメチルブトキシ、1, 2-ジメチルブトキシ、1, 3-ジメチルブト
キシ、2, 2-ジメチルブトキシ、2, 3-ジメチルブトキシ、3, 3-ジメチルブト
15 キシ、1-エチルブトキシ、2-エチルブトキシ、1-エチル-2-メチルプロポキシ
又は1, 1, 2-トリメチルプロポキシ等が例示でき、なかでもメトキシ、エトキシが
好ましい。

アルコキシ基は、更にアルコキシ基を構成する炭素原子上に低級アルコキシ基が置換
されていてもよく、さらに後者の低級アルコキシ基に低級アルコキシ基が置換されてい
20 てもよい。当該置換は、数回繰り返されていてもよい。すなわち、R¹は、式 (I I
a)

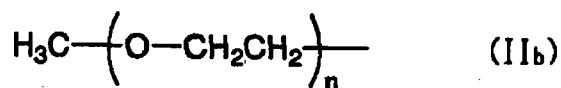
[化19]



(式中、R⁴は低級アルキル基、R⁵は低級アルキレン基、mは1～6の整数を示
す。) で示される基でもあり得る。

25 また、さらに好ましい基として、式 (I I b)

[化20]



(n は1～6の整数を示す。)で示される基が挙げられる。

上記式 (I I a) の R^4 で示される低級アルキル基は、炭素数1～6 (1、2、3、4、5又は6) の直鎖状又は分枝状アルキル基が好ましく、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*sec*-ブチル又は*tert*-ブチル等が例示できる。好ましくはメチル、イソプロピル又は*tert*-ブチルであり、より好ましくはメチルである。

上記式 (I I a) の R^5 で示される低級アルキレン基としては、炭素数1～4 (1、2、3又は4) のアルキレン基が好ましく、具体的にはメチレン、エチレン、トリメチレン又はテトラメチレンが例示できる。より好ましくはエチレンである。 R^5 で示される低級アルキレン基は置換基を有していてもよい。該置換基としては、低級アルキル基 (特に炭素数1～6の直鎖状又は分枝状アルキル基) が挙げられ、例えばメチル又はエチル等が例示できる。

上記式 (I I a) の m は、1～6の整数 (1、2、3、4、5又は6) であり、好ましくは2～5の整数である。上記式 (I I b) の n は、1～6の整数 (1、2、3、4、5又は6) であり、好ましくは1～5の整数であり、より好ましくは2～5の整数である。

上記 R^1 で示される低級アルキル基上に置換する複素環基としては、低級アルキル基を有していてもよい (すなわち、低級アルキル基で置換されていてもよい) ピリジルが好ましい。すなわち、上記 R^1 で示される、複素環基で置換された低級アルキル基としては、低級アルキル基を有していてもよいピリジルで置換された低級アルキル基が好ましい。ピリジルとしては、例えば2-ピリジル、3-ピリジル又は4-ピリジルが挙げられる。該ピリジルが有していてもよい低級アルキル基としては、炭素数1～3の低級アルキル基が好ましく、メチル、エチル、プロピル又はイソプロピルが挙げられる。特に制限されないが、該ピリジルが該低級アルキル基を有する場合、該ピリジルの5位又は6位に該低級アルキル基を有する (即ち、該ピリジルの5位又は6位の水素原子が該低級アルキル基で置換されている) のが好ましい。

R¹は、また、複素環基であり得る。R¹で示される複素環基は、例えば、硫黄原子、酸素原子及び窒素原子からなる群より選択される原子を1～3個含む5～7員芳香族、又は部分若しくは完全還元型の飽和複素環基を示し、例えば、フリル、チエニル、ピロリル、アゼピニル、ピラゾリル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、1, 2, 3-オキサジアゾリル、トリアゾリル、テトラゾリル、チアジアゾリル、ピラニル、ピリジル、ピリダジニル、ピリミジニル、ピラジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、ピロリジニル、ピロリニル、イミダゾリジニル、ピラゾリジニル、ピペリジニル、ピペラジニル、オキサゾリジニル、イソキサゾリジニル、チアゾリジニル、ピラゾリジニル、テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル又は
5 テトラヒドロチオフェニル等であり、好ましくは、飽和複素環基であり、更に好ましくは、酸素原子を含む5乃至6員飽和複素環基であり、更により好ましくは1, 2若しくは3-テトラヒドロフラニル又は1, 2, 3若しくは4-テトラヒドロピラニルであり、特に好ましくは3-テトラヒドロフラニル又は4-テトラヒドロピラニルである。

R²で示される低級アルキル基としては、上記したR¹で示される低級アルコキシ基
15 で置換された低級アルキル基又は複素環基で置換された低級アルキル基における、低級アルキル基と同様のものが例示されるが、好ましくは、メチル、エチル又はイソブチルである。R²で示される低級アルキル基は、フェニル基で置換されていることが好ましい。R²で示されるフェニル基で置換された低級アルキル基の好ましい例は、ベンジル又はフェニルエチルである。

20 R³で示される低級アルキル基としては、炭素数1～6（1、2、3、4、5又は6）の直鎖状又は分枝状アルキル基が好ましく、具体的にはメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、tert-ペンチル、1-メチルブチル、2-メチルブチル、1, 2-ジメチルプロピル、ヘキシル、1-メチルペンチル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、4-メチルペンチル、1, 1-ジメチルブチル、1, 2-ジメチルブチル、1, 3-ジメチルブチル、2, 2-ジメチルブチル、2, 3-ジメチルブチル、3, 3-ジメチルブチル、1-エチルブチル、2-エチルブチル、1-エチル-2-メチルプロピル又は1, 1, 2-トリメチルプロピル等が例示できる。より好ま

25

しくは炭素数2又は3の直鎖状又は分枝状アルキル基である。また、 R^3 で示される低級アルキル基は、シクロアルキル基であってもよい。シクロアルキル基としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル又はシクロヘキシル等が例示でき、好ましくはシクロプロピル又はシクロブチルである。

- 5 該低級アルキル基が置換されてもよいハロゲンとしては、フッ素、塩素又は臭素等が挙げられ、好ましくはフッ素である。該低級アルキル基がハロゲンにより置換されている場合、 R^3 は好ましくはトリフルオロメチル又は2, 2, 2-トリフルオロエチルである。

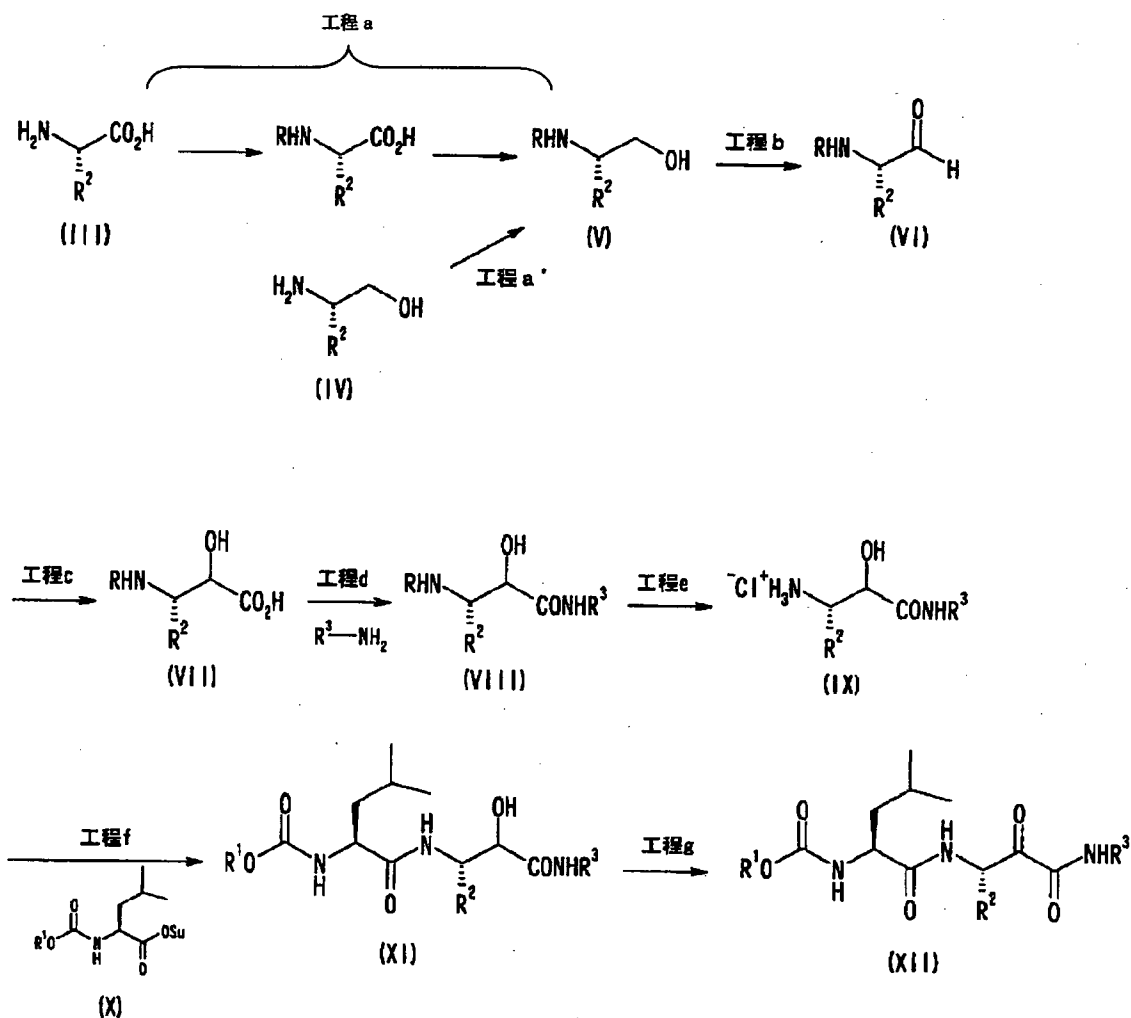
- 10 R^3 で示される、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基は、 R^1 で述べた低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基と同様である。なかでもメトキシ基又はエトキシ基で置換された炭素数1～6（1、2、3、4、5又は6）の低級アルコキシ基が好ましい。また、 R^3 で示される、フェニル基で置換された低級アルキル基は、 R^2 で述べたフェニル基で置換された低級アルキル基と同様である。

- 15 R^3 で示される縮合多環式炭化水素基としては、例えばインダニル、インデニル、ナフチル、アントラニル、ペンタレニル又はアズレニル等が挙げられるが、インダニルが好ましい。

さらに、本発明の滑脳症治療又は予防剤が含有する化合物は、上記化合物の各種の溶媒和や結晶多形の物質ならびにプロドラッグであってもよい。

- 20 上記化合物は、例えば以下の方法で合成できる。また、上記化合物のうちいくつかの化合物は公知である（上記特許文献1参照）。

[化21]



(式中Rは保護基を、その他の基は前記と同意義を示す。)

工程 a は、式 (I) で示されるアミノ酸のアミノ基に保護基を付加し、これを混合酸無水物とした後、還元剤で還元し、式 (V) で示される化合物〔以下、化合物

(V) という。〕を得る工程である。上記保護基の付加、除去は公知の手段により行う

- 5 ことができる。上記保護基としては、例えば、ホルミル又はそれぞれ置換基を有していてもよい C_{1-6} アルキルカルボニル (例えば、アセチル、プロピオニル等)、フェニルカルボニル、 C_{1-6} アルキルオキシカルボニル (例えば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、*tert*-ブトキシカルボニル等)、フェニルオキシカルボニル又は C_7-10 アラルキルオキシカルボニル (例えば、ベンジルオキシカルボニル等のフェニル
- 10 C_{1-4} アルキルオキシカルボニル等) などが用いられる。これらの置換基としては、ハロゲン原子 (例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素等) 又はニトロ基等が用いられ、置

換基の数は1～3個程度である。当該保護基として最も好ましくは、tert-ブトキシカルボニル (Boc) である。

上記反応で用いられる還元剤としては例えば水素化リチウムアルミニウム、水素化ホウ素ナトリウム又は水素化ビス (2-メトキシエトキシ) アルミニウムナトリウム等が
5 挙げられる。好ましくは水素化ホウ素ナトリウムである。反応温度は-40℃から30℃、好ましくは-20℃から0℃である。

化合物 (V) は、式 (IV) で示されるアミノアルコールに、上記アミノ基の保護基を同様に付加することによって得ることもできる (工程 a') 。

工程 b は、化合物 (V) をジメチルスルホキシド (DMSO) の活性化剤存在下、DMSO酸化することにより、式 (VI) で示される化合物 [以下、化合物 (VI) という。] を得る工程である。DMSO酸化は、公知の方法により行うことができ、例えば
10 DMSO単独、あるいはDMSOと酸化反応を阻害しない溶媒 (例えばテトラヒドロフラン、ジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチル、ベンゼン、エーテル等) の混合溶媒に溶解し、化合物 (V) 1モルに対し通常約1～約10倍モルのジイソプロピルエチル
15 ルアミンを添加する。上記におけるDMSOの使用量は、化合物 (V) 1gに対し約1～約20mLである。上記DMSOの活性化剤としては、例えば三酸化硫黄ピリジン錯体、オキサリルクロリド、ジシクロヘキシルカルボジイミド又は無水酢酸等が有利に使用でき、特に三酸化硫黄ピリジン錯体が好適である。

工程 c は、化合物 (VI) を亜硫酸水素ナトリウムで処理した後、シアン化ナトリウムと反応させてシアノヒドリン体とし、このものを精製することなく酸又はアルカリ触媒存在下で加水分解し、 α -ヒドロキシー- β -アミノ酸をジアステレオマーの混合物とし、次いで、この α -ヒドロキシー- β -アミノ酸のアミノ基に上記したアミノ基の保護基を再度同様に付加し、式 (VII) で示される化合物 [以下、化合物 (VII) という。] をジアステレオマーの混合物として得る工程である。
20

25 この加水分解は、酸 (塩酸、硫酸、酢酸、ギ酸等) 又はアルカリ (水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化バリウム等) と共に加熱又は、加熱還流下で行う。加熱温度は、約50～約100℃程度である。溶媒は、有機溶媒 (例えばジオキサン、テトラヒドロフラン等) と水の混合溶媒を好ましく用いることができる。

工程dは、化合物(V I I)を様々なアミンと縮合させて式(V I I I)で示される化合物〔以下、化合物(V I I I)という。〕を得る工程である。

- アミンとしては、目的とする化合物に即して適宜好ましいアミンを選択すればよく、例えばエチルアミン、プロピルアミン、シクロプロピルアミン、ブチルアミン、シクロ
- 5 ブチルアミン、メトキシエチルアミン、2-フェノキシエチルアミン、2-アミノイン
ダン又は2, 2, 2-トリフルオロエチルアミン等が挙げられる。

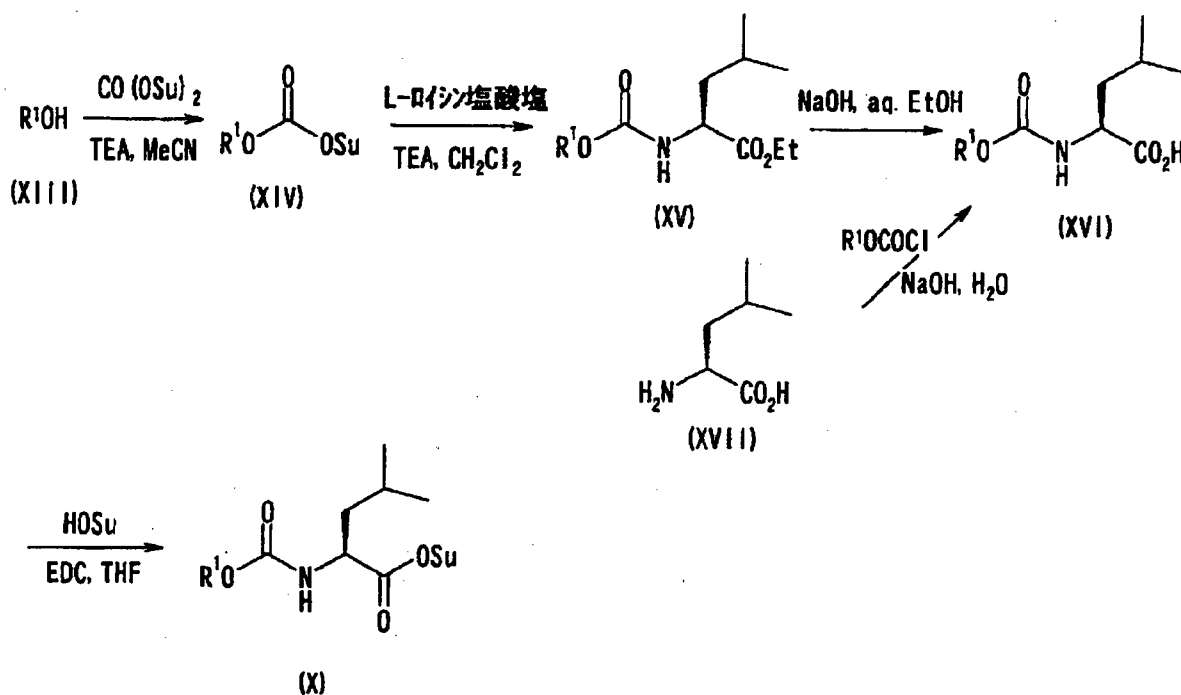
- 上記縮合は、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩及びN, N-ジシクロヘキシルカルボジイミド等の脱水縮合剤の存在下で行うことが好ましい。縮合反応に使用される有機溶媒としてはN, N-ジメチルホルムアミド、D
- 10 MSO、テトラヒドロフラン、ジクロロメタン、メタノール、エタノール、ベンゼン、
トルエン、酢酸エチル又はこれらの混合溶媒等が挙げられるが、好ましくはN, N-ジ
メチルホルムアミドである。反応温度は、氷冷下から室温の範囲である。

- 工程eは、化合物(V I I I)を塩酸酸性下でアミノ保護基の脱離反応により式(I X)で示されるアミン塩酸塩〔以下、化合物(I X)という。〕を得る工程である。ア
- 15 ミノ保護基の脱離反応は、公知の方法により行い得る。例えば、通常使用される有機溶媒に溶解し、酸の存在下攪拌するという方法によりアミノ保護基を脱離することができる。酸としては塩酸、トリフルオロ酢酸又はp-トルエンスルホン酸等が挙げられる。また、市販されている塩酸の酢酸エチル溶液もしくはジオキサン溶液等を用いて脱離することもできる。反応温度は、氷冷下から室温の範囲である。

- 20 工程fは、化合物(I X)と式(X)で示される化合物〔以下、化合物(X)という。〕をトリエチルアミン存在下に縮合することにより式(X I)で示される化合物〔以下、化合物(X I)という。〕を得る工程である。

上記化合物(X)は、例えば、下記の一般的な反応ルートに従い製造することができる。

[化22]



(式中、各記号は前記と同意義である。)

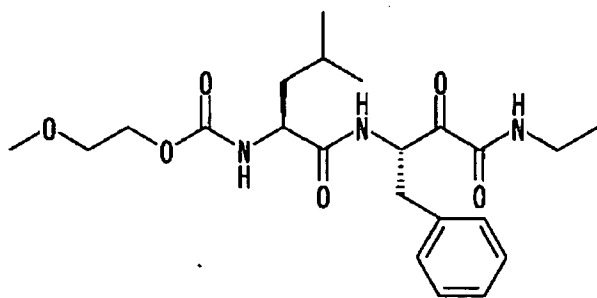
- 式 (XIII) で示されるアルコール [以下、化合物 (XIII) という。] と炭酸ジ (N-スクシンイミジル) とを反応させることにより式 (XIV) で示される混合炭酸エステル体とし、これをトリエチルアミン存在下、L-ロイシンエチルエステル塩酸塩と縮合すると、式 (XV) で示される化合物が得られる。この化合物をアルカリでケン化することによって式 (XVI) で示される化合物 [以下、化合物 (XVI) という。] が得られる。また、化合物 (XVI) は、L-ロイシンとクロロギ酸エステルを直接反応させることによって得ることもできる。得られた化合物 (XVI) はヒドロキ
- シスクシンイミド (HOSu) と反応させ式 (X) で示されるスクシンイミドエステル体 [以下、化合物 (X) という。] が製造できる。

- 工程 g は、化合物 (XI) を酸化することによって式 (XII) で示される化合物 [以下、化合物 (XII) という。] を得る工程である。該酸化方法としては、例えばクロム酸酸化に分類される二クロム酸ピリジニウム (PDC) 酸化、クロロクロム酸ピリジニウム (PCC) 酸化、ジョーンズ (Jones) 酸化、コリンズ (Collins) 酸化、又は DMSO 酸化に分類されるスワン (Swern) 酸化、DMSO-三酸化硫黄ピリジン錯体による酸化、DMSO-ジシクロヘキシルカルボジイミドによる酸

- 化、DMSO-塩化オキサリルによる酸化、又はデスーマーチン試薬 (Desse-Martinperiodinane) を用いるデスーマーチン酸化、次亜ハロゲン酸による酸化、N-ハロゲノカルボン酸アミドによる酸化等、公知の方法を使用することができるが、とりわけデスーマーチン酸化が好ましい。デスーマーチン酸化を用いて酸化する場合は、化合物 (X I) を通常使用される有機溶媒に溶解し、デスーマーチン試薬を加えることで行うことができる。通常使用される有機溶媒としては、例えばジクロロメタン、N, N-ジメチルホルムアミド、DMSO、テトラヒドロフラン、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン又は酢酸エチル等のような反応に悪影響をおよぼさない慣用の溶媒又はそれらの混合溶媒が挙げられるが、好ましくはジクロロメタンである。
- 5 デスーマーチン試薬の使用量は化合物 (X I) に対して約 1 ～ 約 20 倍モル当量で、好ましくは約 1 ～ 約 3 倍モル当量である。反応温度は、特に限定されず、氷冷下から室温付近である。このようにして得られる化合物 (X I I) は、例えば濃縮、減圧濃縮、溶媒抽出、晶出、再結晶、転溶又はクロマトグラフィー等により公知の手段により単離精製することができる。化合物 (X I I) は、一般式 (I) で表される化合物である。
- 15 上記、各工程は、通常使用される反応に悪影響を与えない慣用の溶媒又はそれらの混合溶媒の存在下で行われる。反応に悪影響を与えない溶媒としては、例えばジクロロメタン、N, N-ジメチルホルムアミド、DMSO、テトラヒドロフラン、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン又は酢酸エチルが挙げられる。

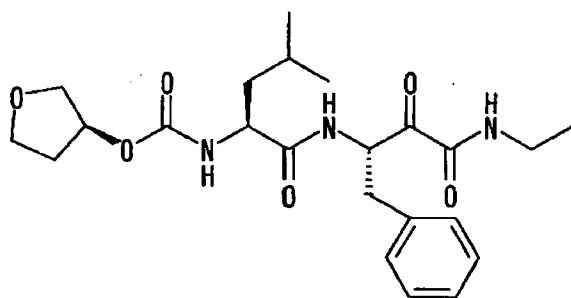
- 上記方法によって製造される一般式 (I) で表される化合物のなかで、本発明の滑脳
- 20 症治療又は予防剤に含まれる好ましい化合物としては、例えば ((1 S) - 1 - ((((1 S) - 1 - ベンジル - 2, 3 - ジオキソ - 3 - (エチルアミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) - 3 - メチルブチル) カルバミン酸 2 - メトキシエチルエステル (化合物 1)、(構造式を下に示す)、

[化 23]



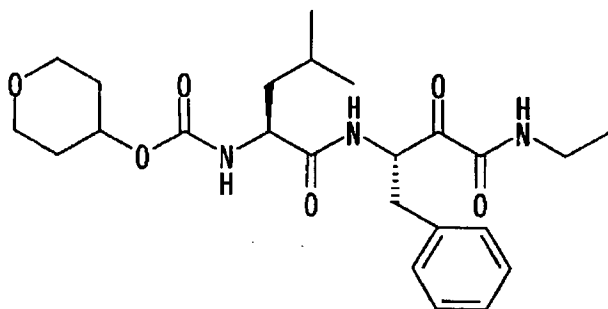
((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(エチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチルカルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステル(化合物2)、(構造式を下に示す)、

[化24]



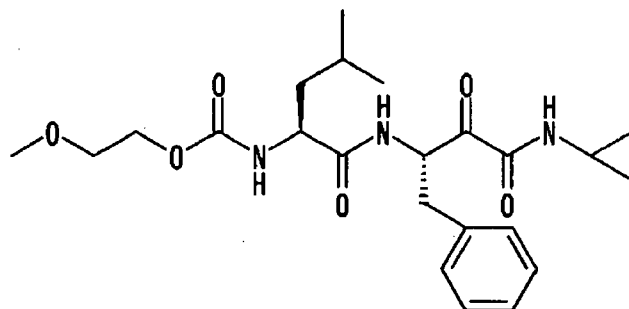
- 5 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(エチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチルカルバミン酸テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルエステル(化合物3)、(構造式を下に示す)、

[化25]



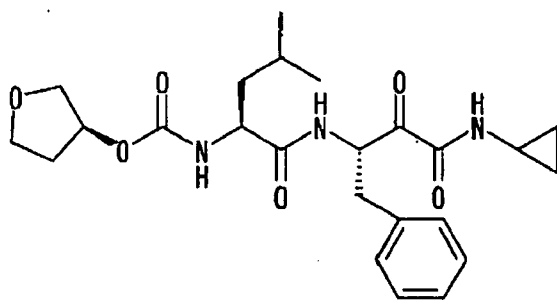
- 10 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチルカルバミン酸2-メトキシエチルエステル(化合物4)、(構造式を下に示す)、

[化26]



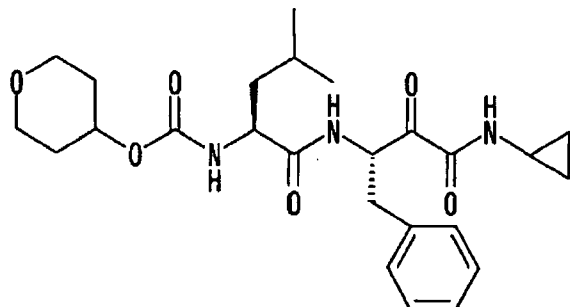
((1 S) - 1 - ((((1 S) - 1 - ベンジル - 3 - (シクロプロピルアミノ) - 2 , 3 - ジオキソプロピル) アミノ) カルボニル) - 3 - メチルブチル) カルバミン酸 (3 S) - テトラヒドロフラン - 3 - イルエステル (化合物 5) 、 (構造式を下に示す) 、

[化 2 7]



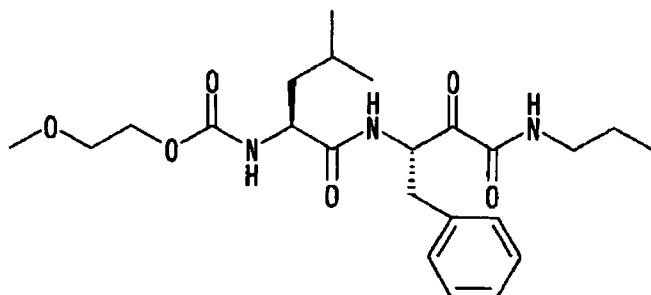
5 ((1 S) -1- (((1 S) -1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2, 3-ジオキソプロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルエステル (化合物6)、(構造式を下に示す)、

[化28]



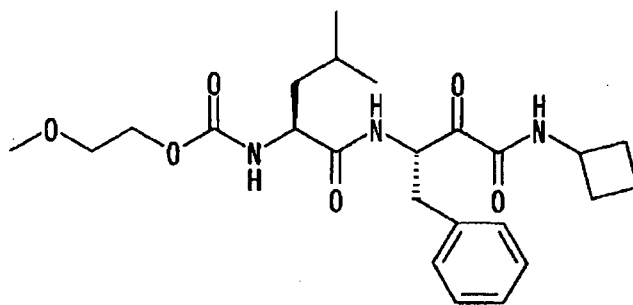
10 ((1S) -1- (((1S) -1-ベンジル-2, 3-ジオキソ-3- (プロピル
アミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸2-メト
キシエチルエステル (化合物7)、 (構造式を下に示す)、

[化29]



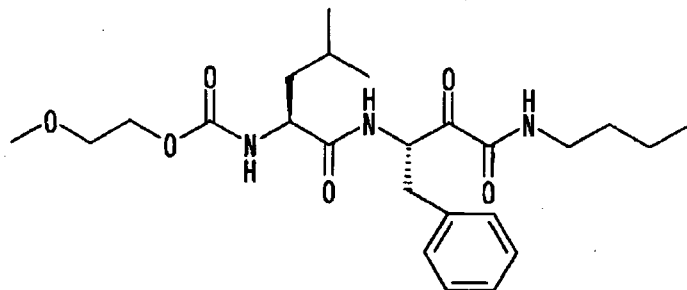
((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロブチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル(化合物8)、(構造式を下に示す)、

5 [化30]



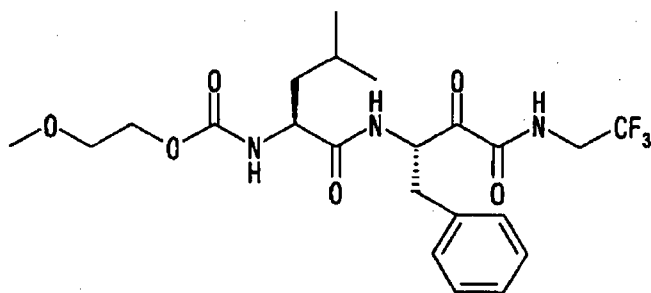
((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-ブチルアミノ-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル(化合物9)、(構造式を下に示す)、

[化31]



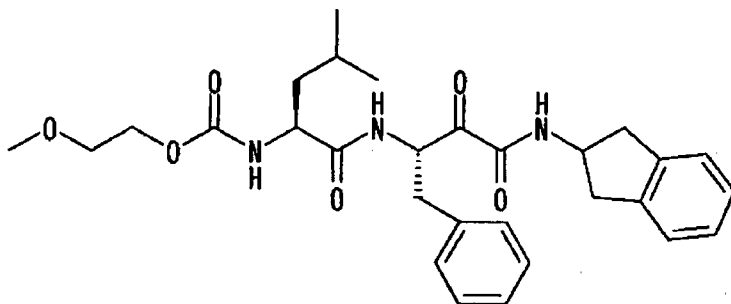
10 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(2,2,2-トリフルオロエチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル(化合物10)、(構造式を下に示す)、

[化32]



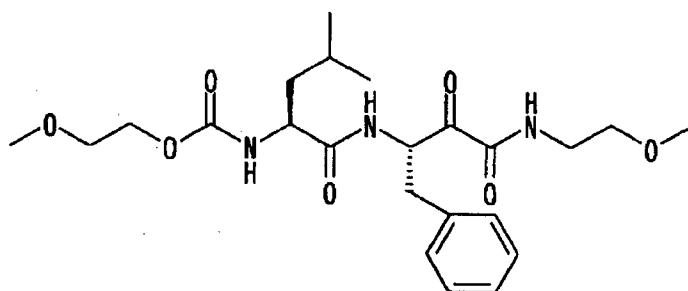
((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(2-イン
ダニルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-
メトキシエチルエステル (化合物11)、(構造式を下に示す)、

[化33]



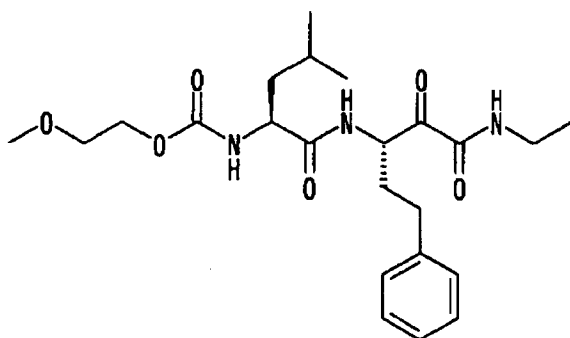
5 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(2-メト
キシエチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン
酸2-メトキシエチルエステル (化合物12)、(構造式を下に示す)、

[化34]



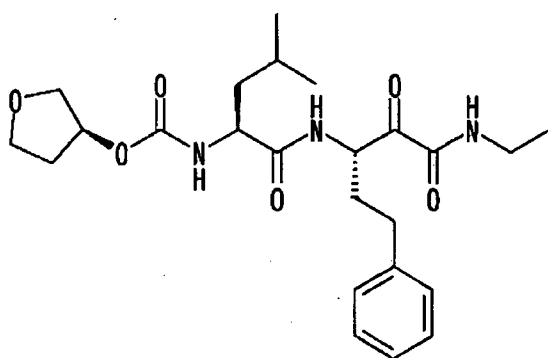
((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-3-エチルアミノ-1-(フェ
ニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-
メトキシエチルエステル (化合物13)、(構造式を下に示す)、

[化35]



((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-3-エチルアミノ-1-(フェニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステル(化合物14)、(構造式を下に示す)、

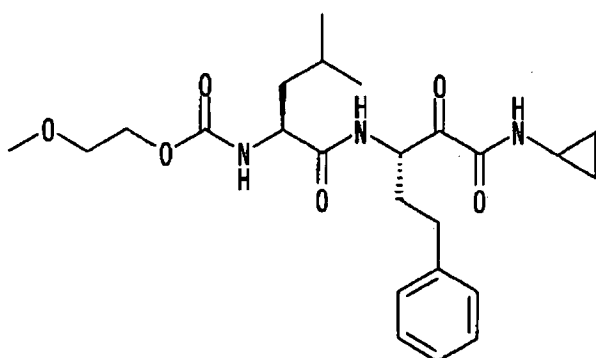
[化36]



5

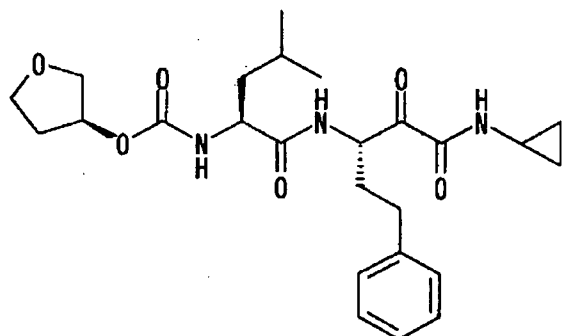
((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-3-シクロプロピルアミノ-1-(フェニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル(化合物15)、(構造式を下に示す)、

[化37]



((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-3-シクロプロピルアミノ-1-(フェニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステル(化合物16)、(構造式を下に示す)、

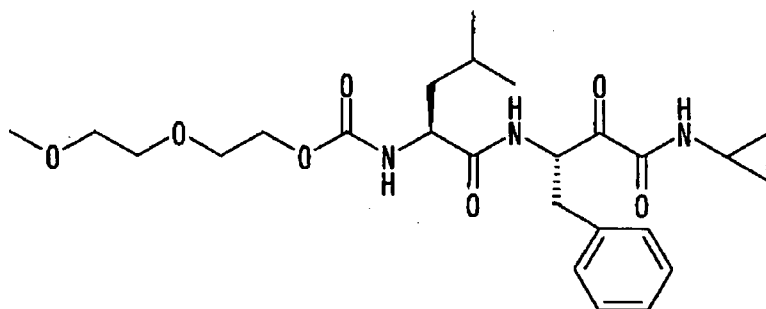
5 [化38]



((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル(化合物17)、(構造式を下に示す)、

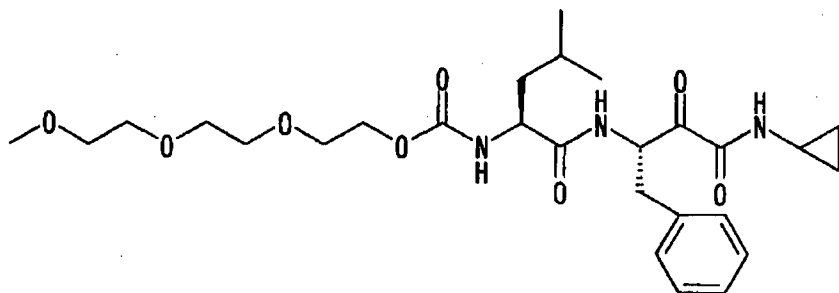
[化39]

10



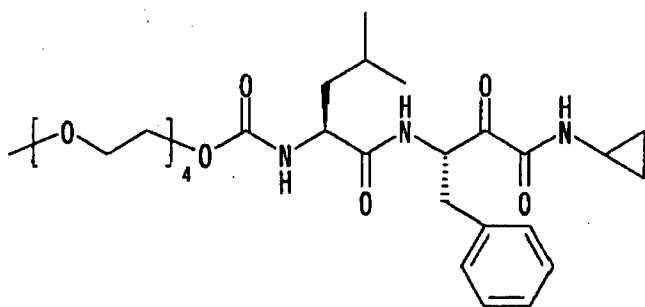
((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルエステル(化合物18)、(構造式を下に示す)、

15 [化40]



((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルエステル (化合物19)、(構造式を下に示す)、

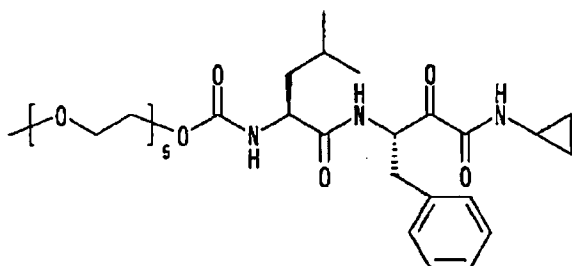
5 [化41]



((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸14-メトキシ-3,6,9,12-テトラオキサテトラデカニルエステル (化合物2

10 0)、(構造式を下に示す)、

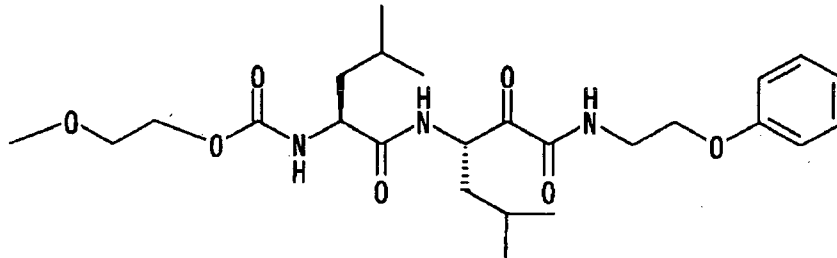
[化42]



((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-1-(2-メチルプロピル)-3-(2-フェノキシエチル)アミノプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブ

チル) カルバミン酸 2-メトキシエチルエステル (化合物 2 1)、(構造式を下に示す)、

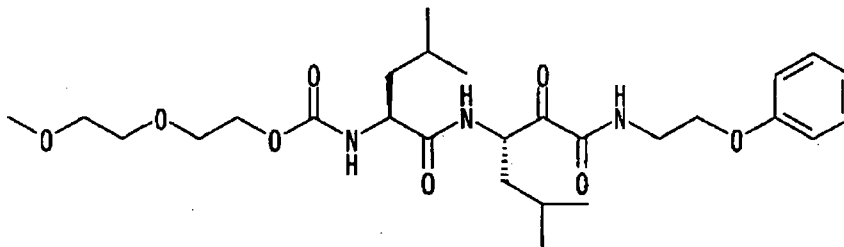
[化 4 3]



((1 S) - 1 - (((1 S) - 2, 3-ジオキソ-1 - (2-メチルプロピル) -
5 3 - (2-フェノキシエチル) アミノプロピル) アミノ) カルボニル) - 3-メチルブ
チル) カルバミン酸 5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル (化合物 2 2)、(構
造式を下に示す)、

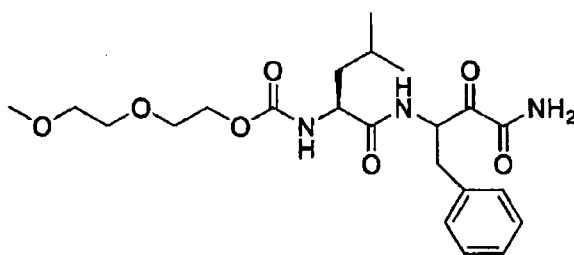
[化 4 4]

10



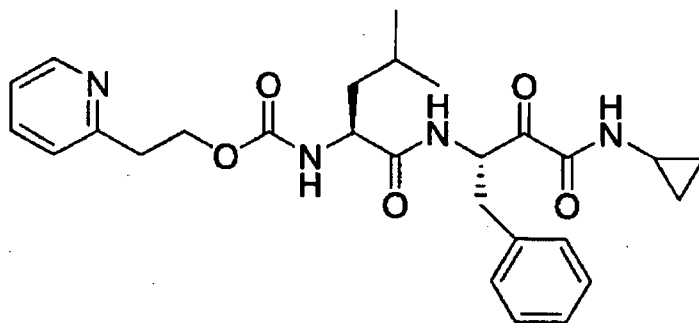
((1 S) - 1 - (((1 R S) - 3-アミノ-1-ベンジル-2, 3-ジオキソプロ
ピル) アミノ) カルボニル) - 3-メチルブチル) カルバミン酸 5-メトキシ-3-
オキサペンチルエステル (化合物 2 3)、(構造式を下に示す)、

[化 4 5]



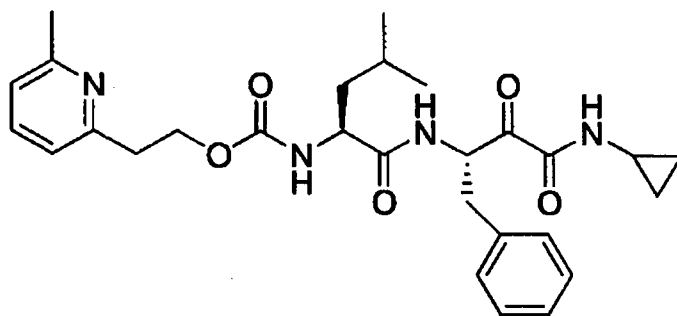
((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(ピリジン-2-イル)エチルエステル(化合物24)、(構造式を下に示す)、

[化46]



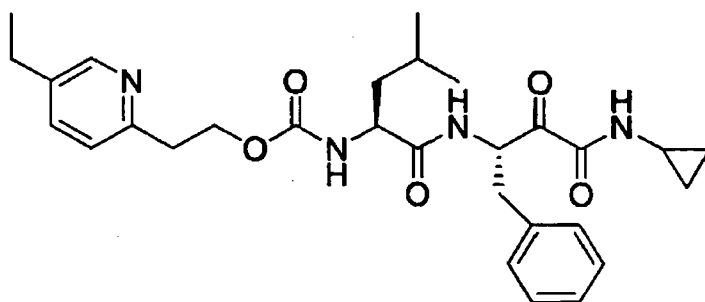
- 5 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(6-メチルピリジン-2-イル)エチルエステル(化合物25)、(構造式を下に示す)、

[化47]

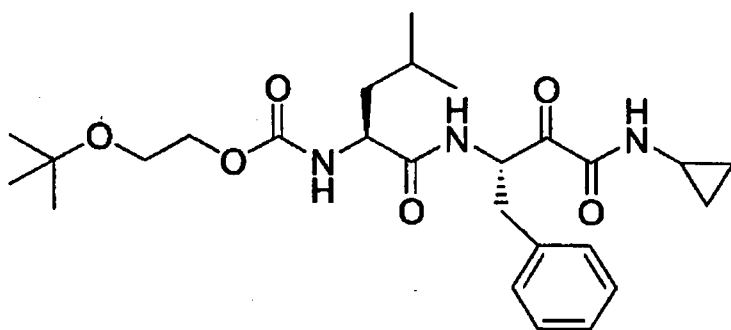


- 10 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(5-エチルピリジン-2-イル)エチルエステル(化合物26)、(構造式を下に示す)、

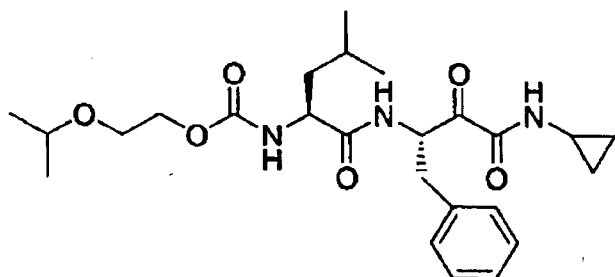
[化48]



((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-tert-ブトキシエチルエステル (化合物27)、(構造式を下に示す)、及び
[化49]



5 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-イソプロポキシエチルエステル (化合物28)、(構造式を下に示す)
[化50]



等が挙げられる。より好ましくは、化合物4、化合物17、化合物18、化合物19、

10 化合物24であり、さらに好ましくは化合物17である。

なお、上記化合物1~28については、上記特許文献1 (特開2006-76989号) に具体的な製造方法及び物性値が記載されている。

これらの化合物は特許文献1に示されるように、優れたカルパイン阻害活性を有しており、本発明の滑脳症治療又は予防剤の有効成分として好ましく用いることができる。

本発明の滑脳症治療又は予防剤を用いることにより、これまで治療が困難であった滑脳症を、母胎中の胎児のみならず、出生後であっても治療することが可能となる。具体的には、本発明の滑脳症治療剤は、母体のみならず、出生後の滑脳症患者に対して投与した場合であっても、滑脳症患者のL I S 1タンパク質の減少を抑制させることができ、このために神経細胞の遊走が回復して滑脳症の症状を改善させることができる。

また、出生前遺伝子診断等により、L I S 1遺伝子のヘテロ変異が確認され、胎児が滑脳症を発症し得る可能性が高いことが判明した場合は、母体に上記一般式（I）で表される化合物を投与することで滑脳症の発症を予防又は治療することもできる（胎児が滑脳症を発症していることが診断できている場合は「治療」であり、診断できていない場合は「予防」である。但し、胎児が滑脳症を発症しているか診断することは困難であるため、通常、母体に上記一般式（I）で表される化合物を投与することは「予防」である。）。さらに、出生前に胎児のL I S 1遺伝子のヘテロ変異が確認されていてもいなくても、また、その他滑脳症発症に関する因子の存在が確認されていてもいなくても、子供が滑脳症を発症するのを予防するために、母体に上記一般式（I）で表される化合物を投与することもできる。つまり、上記一般式（I）で表される化合物は、胎児が滑脳症を患う可能性に関係なく、滑脳症の予防のために母胎に投与して用いることもできる。

本発明の滑脳症治療又は予防剤は、ヒトのみならず、ヒト以外の哺乳動物（例えばラット、マウス、ウサギ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ等）に対しても用いることができる。

また、上記化合物は組織移行性及び吸収性に優れ、血液脳関門も通過し得、かつ毒性も非常に低く安全性にも優れているので、滑脳症の治療又は予防にとって有利であり、よって当該化合物を含有する本発明の滑脳症治療又は予防剤は有利である。本発明の滑脳症治療又は予防剤は全身的又は局所的に投与され得る。全身的には経口投与の他、静脈内注射、皮下注射又は筋肉内注射等非経口的にも投与され得る。局所的には、皮膚、粘膜、鼻又は眼等に投与され得る。

本発明の滑脳症治療又は予防剤は、上記化合物のみからなるものであってもよいし、当該化合物と薬学上許容される担体又は添加剤等とが配合された医薬組成物であってもよい。つまり、本発明は、上記化合物及び薬学上許容される担体又は添加剤等を含む医薬組成物も包含する。当該医薬組成物には、本発明の効果が損なわれない程度において、

- 5 他の薬理活性物質や薬学上許容される任意成分が配合されていてもよい。このような担体、添加剤、任意成分、他の薬理活性物質等は、当業者が目的に応じて適宜選択することができ、また、添加量等の条件も適宜設定することができる。

- 本発明の滑脳症治療又は予防剤が医薬組成物の場合、その製剤形態は、特に制限されないが、粉末剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤又は坐剤等の固形剤、及びシロップ剤、注射剤、点滴剤、点眼剤又は点鼻剤等の液剤等が例示できる。これらのなかでも、経口投与できる剤（経口剤）、注射剤、点滴剤があることが好ましい。これらは、公知の方法により製造することができる。
- 10

- 例えば、顆粒剤及び錠剤として製造する場合には、薬学上許容される添加剤、例えば、賦形剤（乳糖、白糖、ブドウ糖、デンプン、結晶セルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース等）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウム、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム等）、崩壊剤（デンプン、カルメロースナトリウム、炭酸カルシウム等）又は結合剤（デンプン糊液、ヒドロキシプロピルセルロース液、カルメロース液、アラビアゴム液、ゼラチン液、アルギン酸ナトリウム液等）などを用いることにより任意の剤形を製造することができる。また、顆粒剤及び錠剤には、適当なコーティング剤（ゼラチン、白糖、アラビアゴム、カルナバロウ等）又は腸溶性コーティング剤（例えば、酢酸フタル酸セルロース、メタアクリル酸コポリマー、ヒドロキシプロピルセルロースフタレート、カルボキシメチルエチルセルロース等）などで剤皮を施してもよい。
- 15
- 20

- 25 カプセル剤として製造する場合には、公知の賦形剤、例えば、流動性及び滑沢性を向上させるためのステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク又は軽質無水ケイ酸、加圧流動性のための結晶セルロースもしくは乳糖、或いは上記崩壊剤等を適宜選択し、本発明化合物と均等に混和又は粒状、もしくは粒状としたものに適当なコ

ーティング剤で剤皮を施したものをカプセルに充填するか、適当なカプセル基剤（ゼラチン等）に必要な応じてグリセリン又はソルビトール等を加えて塑性を増したカプセル基剤で被包成形してもよい。これらカプセル剤には必要な応じて、着色剤、保存剤〔例えば、二酸化イオウ、パラベン類（パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等）〕等を加えることができる。カプセル剤は、通常のカプセル剤の他、腸溶性コーティングカプセル剤、胃内抵抗性カプセル剤又は放出制御カプセル剤とすることもできる。腸溶性カプセル剤とする場合、腸溶性コーティング剤でコーティングした本発明化合物又は本発明化合物に上記の適当な賦形剤を添加したものを通常のカプセルに充填することができる。あるいは、腸溶性コーティング剤でコーティングしたカプセル、もしくは腸溶性高分子を基剤として成形したカプセルに本発明化合物又は本発明化合物に上記の適当な賦形剤を添加したものを充填することができる。

坐剤として製造する場合には、坐剤基剤（例えば、カカオ脂、マクロゴール等）を適宜選択して使用することができる。

シロップ剤として製造する場合には、例えば、安定剤（エデト酸ナトリウム等）、懸濁化剤（アラビアゴム、カルメロース等）、矯味剤（単シロップ、ブドウ糖等）又は芳香剤等を適宜選択して使用することができる。このような任意成分は、当業者が目的に応じて適宜選択することができ、また、添加量等の条件も適宜設定することができる。

注射剤、点滴剤、点眼剤又は点鼻剤として製造する場合、薬学上許容される添加剤、例えば等張化剤（塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、ブドウ糖、プロピレングリコール等）、緩衝剤（リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液等）、保存剤（パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等）、増粘剤（ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等）、安定化剤（亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、

アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン等)又はpH調整剤(塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等)などを適宜添加した溶液に、上記化合物を溶解又は分散することによって製造することができる。このような薬学上許容される添加剤は、当業者が目的に応じて適宜選択することができ、また、添加量等の条件も適宜設定することができる。

上記注射剤、点眼剤又は点鼻剤における添加剤の添加量は、添加する添加剤の種類、用途等によって異なるが、添加剤の目的を達成し得る濃度を添加すればよい。

本発明の滑脳症治療又は予防剤の投与量は、対象となる滑脳症患者の疾患進行度合、年齢、投与方法等により異なるが、当該治療剤に含まれる有効成分である上記化合物量が、1日あたり約0.1～約2000mg、好ましくは約1～約1500mgを例示できる。特に経口投与又は経血管(好ましくは経静脈)投与する場合は、1日あたり約10～約1500mg、好ましくは約20～約1500mg、より好ましくは約50～約1200mg、さらに好ましくは約100～約1000mgを例示できる。投与は、例えば1日数回(好ましくは1、2、又は3回)に分けて行うことができる。なお、本発明の滑脳症治療剤は、出生後に投与する場合(すなわち、出生後滑脳症治療剤として用いる場合)、出生直後～死亡のいずれの時期においても投与可能であるが、治療効果の面を考慮して、できるだけ早期に(可能であれば滑脳症と診断された直後から)投与を開始することが好ましい。また、母体に投与して胎児を治療(又は胎児の発症を予防)する場合も同様に、胎児が滑脳症と(又は滑脳症となる可能性が大きいと)診断された時点から、できるだけ早期に投与を開始することが望ましい。胎児が滑脳症であるか否か検査を行うことなく予防目的で投与する場合は、妊娠確認後に投与を開始すればよい。母体への投与量については、例えば上記の投与量と同様であり得、また、当業者は上述の範囲内で、患者又は母体の条件に合わせて適宜選択することができる。

また、本発明の滑脳症治療又は予防剤は、一度投薬すると比較的長時間効果が持続するという特徴も有している。例えば、上記化合物が、約50～約1200mg、好ましくは約100～約1000mg含まれる剤を、2日～5日(好ましくは3日)に1回投与するだけで効果が得られると考えられる。

また、本発明の滑脳症治療又は予防剤に含まれる有効成分である上記化合物量は、特に制限されない。例えば、当該治療又は予防剤全体に対して、0.01～100重量%、好ましくは0.1～99重量%、上記化合物が含まれ得る。

5 本発明は、上記の通り、滑脳症患者又は母体に、本発明の滑脳症治療剤を投与すること
とを特徴とする滑脳症治療又は予防方法も提供する。当該方法は、具体的には、前述の
本発明の滑脳症治療又は予防剤を投与することで実施される。なお、当該方法における、
投与対象、投与方法、投与時期、有効成分である上記化合物の投与量等の各条件は前述
の通りである。

10 なお、本発明の滑脳症治療又は予防剤に含有される上記化合物は、他のカルパイン阻
害剤に比べ毒性が特に低く、副作用が比較的低減されている点でも有利である。また、
他のカルパイン阻害剤は、出生後に投与しても血液脳関門を通過できないため滑脳症治
療効果がほとんど得られず、この点でも本発明の滑脳症治療剤は優れている。

実施例

15 以下、本発明を具体的に説明するが、本発明は下記の例に限定されるものではない。
また、以下の検討では、基本的な操作等については、当該分野で著名な教科書（例えば、
Molecular Cloning: A Laboratory Manual (C
old Spring Harbor Laboratory Press)、共焦
点顕微鏡活用プロトコール（羊土社）、タンパク質実験ハンドブック（羊土社）、脳・
20 神経研究の進めかた（羊土社）等を適宜参考にすることができる。

各化合物の合成

上記引用文献1に記載の方法に従って、上記化合物1～28を合成し、結晶を得た。

25 具体的には、次のようにして合成した。なお、以下の化合物の分析値において、融点
はYanaco社製MP-500V型（補正なし）を用いて測定した。核磁気共鳴スペ
クトル（NMR）はVarian製Gemini2000型（300MHz）を用いて
測定した。マトリックス支援イオン化－飛行時間型マススペクトル（MALDI-TO
F MS）は、PerSeptive社製Voyager DE質量分析装置を用いて測

定し、質量数は標準物質 (α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸) で補正した。比は容積比を示す。

[参考例1]

5 N-((2-メトキシエトキシ)カルボニル)-L-ロイシンN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(1) L-ロイシン (25 g, 0.19 mol) を2M水酸化ナトリウム水溶液 (0.12 L) に溶解し、この溶液にクロロギ酸2-メトキシエチルエステル (30 g, 0.22 mol) と1M水酸化ナトリウム水溶液を氷冷条件下で同時にゆっくりと加えた。この溶液を室温で18時間攪拌した後、水 (600 mL) を加え希釈し、ジエチルエーテル (2×200 mL) で洗浄した。水層をアイスバスで冷却し、6M塩酸を加えることでpH3に調整した。この溶液を酢酸エチル (5×150 mL) で抽出し、有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮しN-((2-メトキシエトキシ)カルボニル)-L-ロイシン (41 g, 92%) を無色オイル状物として得た。

(2) N-((2-メトキシエトキシ)カルボニル)-L-ロイシン (20 g, 86 mmol) とN-ヒドロキシコハク酸イミド (13 g, 0.11 mmol) をテトラヒドロフラン (200 mL) に溶解し、そこへ、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (21 g, 0.11 mol) のジクロロメタン (200 mL) 懸濁液を加えた。この溶液を室温で18時間攪拌後、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル (300 mL) で溶解し、この溶液を1M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮し表題化合物 (27 g, 95%) を無色オイル状物として得た。

25 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.89 (d, 3H, $J=6.6$), 0.93 (d, 3H, $J=6.6$), 1.57-1.84 (m, 3H), 2.81 (s, 4H), 3.26 (s, 3H), 3.51 (t, 2H, $J=4.7$), 4.10 (t, 2H, $J=4.7$), 4.40 (m, 1H), 8.04 (d, 1H, $J=8.1$).

[参考例2]

N-((3S)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)カルボニル)-L-ロイシン
N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

5

(1) (S)-3-ヒドロキシテトラヒドロフラン (1.0 g, 11 mmol) のアセト
ニトリル (50 mL) 溶液を攪拌しながら、N, N'-ジスクシンイミジルカルボナ
ート (4.3 g, 17 mmol) とトリエチルアミン (4.4 g, 17 mmol, 4.
8 mL) を室温で加えた。この溶液を室温で18時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣
10 に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (100 mL) を加え、酢酸エチル (200 mL) で
抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮し
N-スクシンイミジル (3S)-3-テトラヒドロフラニルカルボナート (2.6 g)
を定量的に褐色オイル状物として得た。

(2) L-ロイシンエチルエステル塩酸塩 (2.7 g, 14 mmol) とトリエチル
15 アミン (2.9 g, 28 mmol) のジクロロメタン溶液 (50 mL) にN-スクシン
イミジル (3S)-3-テトラヒドロフラニルカルボナート (2.6 g, 11 mmol)
のジクロロメタン (20 mL) 溶液を加えた。この反応液を室温で18時間攪拌し、
減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル (200 mL) で溶解し、この溶液を1M塩酸、飽和
炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、
20 減圧濃縮した。残渣をヘキサンで洗浄しN-((3S)-テトラヒドロフラン-3-
イルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステル (3.1 g, 98%) を白色
固体として得た。

(3) N-((3S)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)カルボニル)-L-
ロイシンエチルエステル (2.9 g, 11 mmol) のエタノール (100 mL) 溶
25 液に1M水酸化ナトリウム水溶液 (33 mL) を加えた。この溶液を氷冷下で3時間攪
拌した後、塩酸を加えることでpH3に調整した。エタノールを減圧留去し、酢酸エチ
ルで抽出した。有機層を1M塩酸及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱
水後、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン混液で結晶化しN-((3S)-

テトラヒドロフラン-3-イルオキシ) カルボニル) -L-ロイシン (2.6 g, 85%) を無色結晶として得た。

融点: 94.9-96.0° C.

- (4) N-((2-メトキシエトキシ) カルボニル) -L-ロイシンの代わりにN-
5 ((3S)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンを用いて参考例1(2)と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.89 (d, 3H, $J=6.0$),
0.92 (d, 3H, $J=6.3$), 1.55-1.82 (m, 3H), 1.88 (m,
10 1H), 2.12 (m, 1H), 2.81 (s, 4H), 3.64-3.84 (m, 4H), 4.39 (m, 1H), 5.15 (m, 1H), 8.04 (d, 1H, $J=7.8$).

[参考例3]

- 15 N-((テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルオキシ) カルボニル) -L-ロイシン
N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(1) (S)-3-ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりに4-ヒドロキシテトラ
ヒドロ-4H-ピランを用いて参考例2(1)と同様の反応を行い、N-スクシンイミ
20 ジルテトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルカルボナートを褐色オイル状物として得た。

(2) N-スクシンイミジル(3S)-3-テトラヒドロフランカルボナートの代
わりにN-スクシンイミジルテトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルカルボナートを用
いて参考例2(2)と同様の反応を行い、N-((テトラヒドロ-4H-ピラン-4-
イルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンエチルエステルを無色固体として得た。

- 25 (3) N-(((3S)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ) カルボニル) -L-
ロイシンエチルエステルの代わりにN-((テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イル
オキシ) カルボニル) -L-ロイシンエチルエステルを用いて参考例2(3)と同様の

反応を行い、N-（（テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルオキシ）カルボニル）-L-ロイシンを無色固体として得た。

(4) N-（（2-メトキシエトキシ）カルボニル）-L-ロイシンの代わりにN-（（テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルオキシ）カルボニル）-L-ロイシンを用

5 いて参考例1（2）と同様の反応を行い、表題化合物を無色固体として得た。

$^1\text{H-NMR}$ （300MHz, DMSO- d_6 ） δ 0.89（d, 3H, $J=6.0$ ）, 0.92（d, 3H, $J=6.3$ ）, 1.43-1.93（m, 7H）, 2.80（s, 4H）, 3.42（m, 2H）, 3.78-3.82（m, 2H）, 4.39（m, 1H）, 4.72（m, 1H）, 7.94（d, 1H, $J=7.8$ ）.

〔参考例4〕

N-（（5-メトキシ-3-オキサペンチルオキシ）カルボニル）-L-ロイシンN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

15

(1) (S)-3-ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりにジエチレングリコールモノメチルエーテルを用いて参考例2（1）と同様の反応を行い、5-メトキシ-3-オキサペンチルN-スクシンイミジルカルボナートを無色オイル状物として得た。

(2) N-スクシンイミジル（3S）-3-テトラヒドロフラニルカルボナートの代わりに5-メトキシ-3-オキサペンチルN-スクシンイミジルカルボナートを用いて参考例2（2）と同様の反応を行い、N-（（5-メトキシ-3-オキサペンチルオキシ）カルボニル）-L-ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。

(3) N-（（（3S）-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ）カルボニル）-L-ロイシンエチルエステルの代わりにN-（（5-メトキシ-3-オキサペンチルオキシ）カルボニル）-L-ロイシンエチルエステルを用いて参考例2（3）と同様の反応を行い、N-（（5-メトキシ-3-オキサペンチルオキシ）カルボニル）-L-ロイシンを無色オイル状物として得た。

25

(4) N-((2-メトキシエトキシ)カルボニル)-L-ロイシンの代わりにN-((5-メトキシ-3-オキサペンチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンを用いて参考例1(2)と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

- 5 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.90 (dd, 6H, $J=9.5$, 6.5), 1.56-1.80 (m, 3H), 2.80 (s, 4H), 3.24 (s, 3H), 3.41-3.46 (m, 2H), 3.50-3.54 (m, 2H), 3.56-3.60 (m, 2H), 4.08-4.11 (m, 2H), 4.39 (m, 1H), 8.05 (d, 1H, $J=7.8$).

10

[参考例5]

N-((8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシン
N-ヒドロキシスクシンイミドエステル

- 15 (1) (S)-3-ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりにトリエチレングリコールモノメチルエーテルを用いて参考例2(1)と同様の反応を行い、8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルN-スクシンイミジルカルボナートを無色オイル状物として得た。
- (2) N-スクシンイミジル(3S)-3-テトラヒドロフランカルボナートの代わりに8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルN-スクシンイミジルカルボナートを用いて参考例2(2)と同様の反応を行い、N-((8-メトキシ-3,6-ジオキサ
- 20 オクチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。
- (3) N-(((3S)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルの代わりにN-((8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルを用いて参考例2(3)と同様の
- 25 反応を行い、N-((8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンを無色オイル状物として得た。

(4) N-((2-メトキシエトキシ)カルボニル)-L-ロイシンの代わりにN-((8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンを用いて参考例1(2)と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

- 5 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.89 (d, 3H, $J=6.3$), 0.92 (d, 3H, $J=6.3$), 1.56-1.82 (m, 3H), 2.81 (s, 4H), 3.24 (s, 3H), 3.43 (m, 2H), 3.52 (m, 6H), 3.59 (m, 2H), 4.10 (m, 2H), 4.40 (m, 1H), 8.06 (d, 1H, $J=7.8$).

10

[参考例6]

N-((11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

- 15 (1) (S)-3-ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりにテトラエチレングリコールモノメチルエーテルを用いて参考例2(1)と同様の反応を行い、11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルN-スクシンイミジルカルボナートを無色オイル状物として得た。

- 20 (2) N-スクシンイミジル(3S)-3-テトラヒドロフラニルカルボナートの代わりに11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルN-スクシンイミジルカルボナートを用いて参考例2(2)と同様の反応を行い、N-((11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。

- 25 (3) N-((3S)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルの代わりにN-((11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルを用いて参考例2(3)と同様の反応を行い、N-((11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンを無色オイル状物として得た。

(4) N-((2-メトキシエトキシ)カルボニル)-L-ロイシンの代わりにN-((11-メトキシ-3, 6, 9-トリオキサウンデカニルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンを用いて参考例1(2)と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

5

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.91 (dd, 6H, $J=9.3$, 6.3), 1.56-1.77 (m, 3H), 2.81 (s, 4H), 3.24 (s, 3H), 3.41-3.44 (m, 2H), 3.49-3.52 (m, 10H), 3.59 (t, 2H, $J=4.7$), 4.08-4.11 (m, 2H), 4.38 (m, 10 H), 8.06 (d, 1H, $J=7.8$).

[参考例7]

N-((14-メトキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカニルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

15

(1) (S)-3-ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりにペンタエチレングリコールモノメチルエーテルを用いて参考例2(1)と同様の反応を行い、14-メトキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカニルN-スクシンイミジルカルボナートを無色オイル状物として得た。

20 (2) N-スクシンイミジル(3S)-3-テトラヒドロフランカルボナートの代わりに14-メトキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカニルN-スクシンイミジルカルボナートを用いて参考例2(2)と同様の反応を行い、N-((14-メトキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカニルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。

25 (3) N-(((3S)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルの代わりにN-((14-メトキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカニルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルを用いて参考例2(3)と同様の反応を行い、N-((14-メトキシ-3, 6, 9, 12-

テトラオキサテトラデカニルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンを無色オイル状物として得た。

- (4) N-((2-メトキシエトキシ) カルボニル) -L-ロイシンの代わりにN-((14-メトキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカニルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンを用いて参考例1(2)と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.89 (d, 3H, $J=6.6$), 0.92 (d, 3H, $J=6.3$), 1.57-1.82 (m, 3H), 2.81 (s, 4H), 3.24 (s, 3H), 3.43 (m, 2H), 3.51 (m, 14H), 3.59 (m, 2H), 4.10 (m, 2H), 4.40 (m, 1H), 8.05 (d, 1H, $J=7.8$).

[参考例8]

- 15 (3S)-3-アミノ-N-エチル-2-ヒドロキシ-4-フェニルブタナミド塩酸塩

(1) L-フェニルアラニノール (5.0 g, 66 mmol) のテトラヒドロフラン (1.3 L) と水 (630 mL) の溶液にジ-tert-ブチルジカルボナート (140 g, 0.67 mol) のテトラヒドロフラン (500 mL) 溶液と1M水酸化ナトリウム水溶液 (660 mL) を氷冷条件下で同時にゆっくりと加えた。この溶液を室温で18時間攪拌し、有機溶媒を減圧留去した後、酢酸エチル (1 L) を加えた。この溶液を1M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮した。得られた白色固体を酢酸エチル/ヘキサン (1:10) 混液から再結晶しN-(tert-ブトキシカルボニル) -L-フェニルアラニノール (7.0 g, 84%) を無色結晶として得た。

(2) N-(tert-ブトキシカルボニル) -L-フェニルアラニノール (6.9 g, 0.28 mol) をDMSO (280 mL) とジクロロメタン (140 mL) に溶解し、この溶液をアイスバスで冷却した。そこへ、N,N-ジイソプロピルエチルアミン

(110 g, 0.82 mol) と精製した三酸化イオウピリジン錯体の (130 g, 0.82 mol) の DMSO (100 mL) 懸濁液を加えた。この溶液を氷冷下で 1 時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで (1.5 L) で希釈し、1 M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮した。

- 5 残渣を酢酸エチル／ヘキサン混液から結晶化し N- (tert-ブトキシカルボニル) -L-フェニルアラニナル (53 g, 77%) を無色結晶として得た。

(3) N- (tert-ブトキシカルボニル) -L-フェニルアラニナル (17 g, 67 mmol) をメタノール (100 mL) に溶解し、この溶液を 5° C に冷却した。

- 10 亜硫酸水素ナトリウム (7.0 g, 67 mmol) を水 (150 mL) に溶解し、5° C に冷却した。この溶液をアルデヒド溶液に加え 5° C で 18 時間攪拌した。青酸ナトリウム (4.0 g, 81 mmol) を水 (100 mL) に溶かし、酢酸エチル (300 mL) とともに上記の反応液へ加えた。この反応液を室温で 5 時間攪拌した。有機層を分離し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮し、シアノヒドリン体を無色オイル状物として得た。このシアノヒドリン体をジオキサン (250 mL) と濃塩酸 (250 mL) に溶解し、これにアニソール (10 mL) を加えた。この溶液を 18 時間緩やかに還流した。この反応液を室温に冷却後、減圧濃縮し褐色半固状物質を得た。これを水 (100 mL) に溶解し、ジエチルエーテル (3×50 mL) で洗浄した。水層を Dowex 50X8 カラム (100-200 mesh, H⁺ 型; 25×1.8 cm) に付し、pH 5.5 になるまで水で洗浄し、2 M アンモニウム水 (約 1.5 L) で溶出した。溶出したアンモニウム水を減圧濃縮して (3S) -3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸 (12 g, 88%) を白色固体として得た。
- 15 20

- (4) (3S) -3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸 (11 g, 56.34 mmol) を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (70 mL) に溶解し、この溶液にジ-tert-ブチルジカルボナート (12 g, 57 mmol) のジオキサン (70 mL) 溶液を加えた。この溶液を、1 M 水酸化ナトリウム水溶液を適宜加えることで pH 10~11 に保持しながら、室温で 18 時間攪拌した。そこへ、水 (600 mL) を加え希釈し、ジエチルエーテル (2×200 mL) で洗浄した。この水層をアイスバスで冷却しながら、1 M 塩酸を加えることにより pH 2 に調整し、ジエチルエーテル (3×250 mL) で洗浄した。
- 25

L) で抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水後、濃縮し (3S) - 3 - (tert-ブトキシカルボニルアミノ) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニル酪酸 (12 g, 72%) を無色固体のジアステレオマーの混合物として得た。

(5) (3S) - 3 - (tert-ブトキシカルボニルアミノ) - 2 - ヒドロキシ - 4 - フェニル酪酸 (6.3 g, 21 mmol) と 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール (3.0 g, 22.4 mmol) を DMF (45 mL) に溶解し、アイスバスで冷却した。そこへ、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (4.6 g, 24 mmol) を加えた後、さらにエチルアミン水溶液 (3.0 mL) を加えた。この溶液を 18 時間攪拌した。この溶液を酢酸エチル (200 mL) で希釈した後、1M 塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮し ((1S) - 1 - ベンジル - 3 - エチルアミノ - 2 - ヒドロキシ - 3 - オキソプロピル) カルバミン酸 1, 1 - ジメチルエチルエステル (5.8 g, 84%) を白色固体として得た。

(6) ((1S) - 1 - ベンジル - 3 - エチルアミノ - 2 - ヒドロキシ - 3 - オキソプロピル) カルバミン酸 1, 1 - ジメチルエチルエステル (5.5 g, 17 mmol) を 4N 塩酸 / ジオキサン溶液 (65 mL) に溶解し、この溶液を室温で 3 時間攪拌した。この溶液を減圧濃縮して表題化合物 (4.4 g) を定量的に白色固体として得た。

融点: 162.8 - 163.3° C. (Major), ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 1.02 (t, 3H, J=7.2), 2.93 (m, 2H), 3.05 - 3.20 (m, 2H), 3.60 (m, 1H), 3.88 (m, 1H), 6.75 (d, 1H, J=6.0), 7.19 - 7.37 (m, 5H), 8.08 (m, 1H), 8.17 (br s, 3H). (Minor), ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 0.97 (t, 3H, J=7.4), 2.80 (d, 2H, J=6.9), 3.00 (m, 2H), 3.69 (m, 1H), 4.26 (m, 1H), 6.53 (d, 1H, J=5.4), 7.19 - 7.37 (m, 5H), 8.03 (t, 1H, J=5.7), 8.17 (br s, 3H).

[参考例9]

(3S) - 3-アミノ-N-シクロプロピル-2-ヒドロキシ-4-フェニルブタナミド塩酸塩

- 5 エチルアミン水溶液の代わりにシクロプロピルアミンを用いて参考例8 (5) と同様の反応を行い、((1S) - 1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル) カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

- ((1S) - 1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル) カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルの代わりに ((1S) - 1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル) カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8 (6) と同様の反応を行い、表題化合物を白色固体として得た。

- 15 融点: 162.9-163.3°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.44 (m, 2H), 0.57 (m, 2H), 2.50 (m, 0.5H), 2.65 (m, 0.5H), 2.82 (d, 1H, $J=6.9$), 2.94 (m, 1H), 3.60 (m, 0.5H), 3.70 (m, 0.5H), 3.87 (m, 0.5H), 4.26 (d, 0.5H, $J=2.4$), 6.45 (br s, 0.5H), 6.69 (br s, 0.5H), 7.23-7.35 (m, 5H), 7.99 (d, 0.5H, $J=4.2$), 8.08 (br s, 1.5H), 8.09 (d, 0.5H, $J=4.5$), 8.23 (br s, 1.5H).

[参考例10]

- 25 (3S) - 3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル-N-プロピルブタナミド塩酸塩

エチルアミン水溶液の代わりにプロピルアミンを用いて参考例8 (5) と同様の反応を行い、((1S)-1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-オキソ-3-(プロピルアミノ)プロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

5 ((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルの代わりに((1S)-1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-オキソ-3-(プロピルアミノ)プロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8 (6) と同様の反応を行い、表題化合物を白色固体として得た。

10 融点: 127.8-129.5°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.82 (m, 3H), 1.35-1.47 (m, 2H), 2.82 (m, 0.5H), 2.95 (m, 3H), 3.09 (m, 0.5H), 3.58 (m, 0.5H), 3.70 (m, 0.5H), 3.92 (m, 0.5H), 4.31 (m, 0.5H), 6.55 (d, 0.5H, $J=4.8$), 6.77 (d, 0.5H, $J=6.6$), 7.21-7.36 (m, 5H), 7.98-8.15 (m, 2.5H), 8.24 (br s, 1.5H).

15

[参考例11]

(3S)-3-アミノ-N-シクロブチル-2-ヒドロキシ-4-フェニルブタナミド
20 塩酸塩

エチルアミン水溶液の代わりにシクロブチルアミンを用いて参考例8 (5) と同様の反応を行い、((1S)-1-ベンジル-3-シクロブチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

25

((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルの代わりに((1S)-1-ベンジル-3-シクロブチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1,

1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8(6)と同様の反応を行い、表題化合物を白色固体として得た。

融点: 162.5-163.7°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ

- 5 1.59 (m, 2H), 1.88-2.18 (m, 4H), 2.80 (d, 1H, $J=6.6$), 2.91 (m, 1H), 3.58 (m, 0.5H), 3.69 (m, 0.5H), 3.87 (m, 0.5H), 4.08 (m, 0.5H), 4.16-4.24 (m, 1H), 6.50 (d, 0.5H, $J=5.4$), 6.72 (d, 0.5H, $J=6.0$), 7.21-7.33 (m, 5H), 8.05 (br s, 1.5H), 8.19 (d, 0.5H, $J=7.8$), 8.20 (br s, 1.5H), 8.29 (d, 0.5H, $J=8.1$).
- 10

[参考例12]

(3S)-3-アミノ-N-ブチル-2-ヒドロキシ-4-フェニルブタナミド塩酸塩

15

エチルアミン水溶液の代わりにブチルアミンを用いて参考例8(5)と同様の反応を行い、((1S)-1-ベンジル-3-ブチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

- ((1S) - 1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルの代わりに ((1S) - 1-ベンジル-3-ブチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8(6)と同様の反応を行い、表題化合物を白色固体として得た。
- 20

- 25 融点: 141.0-141.4°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ
0.86 (m, 3H), 1.16-1.47 (m, 4H), 2.80 (m, 0.5H), 2.99 (m, 3H), 3.13 (m, 0.5H), 3.57 (m, 0.5H), 3.70 (m, 0.5H), 3.92 (m, 0.5H), 4.30 (m, 0.5H), 6.

5 3 (b r s, 0. 5H) , 6. 7 7 (d, 0. 5H, J=6. 6) , 7. 1 9-7. 3 9 (m, 5H) , 7. 9 7-8. 1 5 (m, 2. 5H) , 8. 2 2 (s, 1. 5H) .

[参考例 1 3]

- 5 (3 S) - 3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル-N-(2, 2, 2-トリフルオロエチル) ブタナミド塩酸塩

エチルアミン水溶液の代わりに2, 2, 2-トリフルオロエチルアミンを用いて参考例
8 (5) と同様の反応を行い、((1 S) - 1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-オキ
10 ソ-3-(2, 2, 2-トリフルオロエチルアミノ) プロピル) カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

- ((1 S) - 1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピ
ル) カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルの代わりに((1 S) - 1-ベンジ
ル-2-ヒドロキシ-3-オキソ-3-(2, 2, 2-トリフルオロエチルアミノ) プ
15 ロピル) カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8 (6) と同様の
の反応を行い、(3 S) - 3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル-N-(2, 2,
2-トリフルオロエチル) ブタナミド塩酸塩を白色固体として得た。

- 融点: 103. 0-108. 5°C. ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ
20 2. 71-2. 85 (m, 1H) , 2. 88-2. 97 (m, 1H) , 3. 60-3. 82 (m, 2. 5H) , 3. 91-4. 05 (m, 1H) , 4. 45 (m, 0. 5H) ,
6. 75 (d, 0. 5H, J=5. 7) , 6. 98 (d, 0. 5H, J=6. 3) , 7. 20-7. 35 (m, 5H) , 8. 12 (b r s, 1. 5H) , 8. 25 (b r s,
1. 5H) , 8. 70 (m, 1H) .

25

[参考例 1 4]

(3 S) - 3-アミノ-2-ヒドロキシ-N-(2-インダニル) -4-フェニルブタ
ナミド塩酸塩

エチルアミン水溶液の代わりに2-アミノインダンを用いて参考例8 (5) と同様の反応を行い、((1S)-1-ベンジル-3-(2-インダニルアミノ)-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルの代わりに((1S)-1-ベンジル-3-(2-インダニルアミノ)-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8 (6) と同様の反応を行い、

(3S)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-N-(2-インダニル)-4-フェニルブタナミド塩酸塩を白色固体として得た。

融点: 183.0-184.8°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ
2.76-2.96 (m, 4H), 3.01-3.18 (m, 2H), 3.62 (m, 0.5H), 3.74 (m, 0.5H), 3.92 (m, 0.5H), 4.25-4.39 (m, 1H), 4.49 (m, 0.5H), 6.48 (d, 0.5H, $J=5.7$), 6.72 (d, 0.5H, $J=5.7$), 7.13-7.35 (m, 9H), 8.15 (m, 3.5H), 8.26 (d, 0.5H, $J=7.2$).

[参考例15]

(3S)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-N-(2-メトキシエチル)-4-フェニルブタナミド塩酸塩

エチルアミン水溶液の代わりにメトキシエチルアミンを用いて参考例8 (5) と同様の反応を行い、((1S)-1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-(2-メトキシエチル)-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

((1S) -1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル) カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルの代わりに ((1S) -1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3- (2-メトキシエチル) -3-オキソプロピル) カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8 (6) と同様の反応を行い、 (3S) -3-アミノ-2-ヒドロキシ-N- (2-メトキシエチル) -4-フェニルブタナミド塩酸塩を白色固体として得た。

融点: 113.9-117.7°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ
2.82 (d, 1H, $J=6.6$), 2.95 (m, 1H), 3.10-3.19 (m, 2H), 3.22 (s, 1.5H), 3.23 (s, 1.5H), 3.28-3.34 (m, 2H), 3.57 (m, 0.5H), 3.70 (m, 0.5H), 3.92 (m, 0.5H), 4.32 (m, 0.5H), 6.59 (d, 0.5H, $J=4.5$), 6.87 (d, 0.5H, $J=6.0$), 7.22-7.36 (m, 5H), 7.92 (t, 0.5H, $J=5.7$), 7.98 (t, 0.5H, $J=5.1$), 8.09 (br s, 1.5H), 8.24 (br s, 1.5H).

[参考例16]

(3S) -3-アミノ-N-エチル-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタナミド塩酸塩

20

(1) Boc-L-ホモフェニルアラニン (20g, 72mmol) のジメトキシエタン (100mL) 溶液にN-メチルモルホリン (7.2g, 72mmol) とクロロギ酸イソブチル (9.8g, 72mmol) を氷冷条件下で加えた。攪拌1時間後、反応液をろ過し、ろ液をアイスバスで冷却し、水素化ホウ素ナトリウム (4.1g, 107mmol) の水溶液 (10mL) を加え、さらに水 (300mL) を加えた。生じた沈殿物をろ取して、これを水及びメタノールで洗浄しN- (tert-ブトキシカルボニル) -L-ホモフェニルアラニノール (15g, 79%) を無色結晶として得た。

(2) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニノールの代わりにN-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ホモフェニルアラニノールを用いて参考例8(2)と同様の反応を行い、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ホモフェニルアラニノールを無色オイル状物として得た。

5 (3) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニノールの代わりにN-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ホモフェニルアラニノールを用いて参考例8(3)と同様の反応を行い、(3S)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸を白色固体として得た。

(4) (3S)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸の代わりに(3S)-3-アミノ-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸を用いて参考例8(4)と同様の反応を行い、(3S)-3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸を無色オイル状物として得た。

(5) (3S)-3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸の代わりに(3S)-3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタン酸を用いて参考例8(5)と同様の反応を行い、((1S)-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソ-1-(フェニルエチル)プロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

(6) ((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルの代わりに((1S)-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソ-1-(フェニルエチル)プロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8(6)と同様の反応を行い、(3S)-3-アミノ-N-エチル-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタナミド塩酸塩を白色固体として得た。

25 融点: 134.4-134.9°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.99-1.06 (m, 3H), 1.65-1.96 (m, 2H), 2.54-2.76 (m, 2H), 3.07-3.23 (m, 2H), 4.15 (br s, 0.5H), 4.25 (br s, 0.5H), 6.44 (br s, 0.5H), 6.55

(b r s, 0. 5H) , 7. 17-7. 33 (m, 5H) , 7. 99 (b r s, 1. 5H) , 8. 15 (t, 1H, J=6. 2) , 8. 23 (b r s, 1. 5H) .

[参考例17]

- 5 (3S) - 3-アミノ-N-シクロプロピル-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタナミド塩酸塩

エチルアミン水溶液の代わりにシクロプロピルアミンを用いて参考例16(5)と同様の反応を行い、((1S) - 3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソ-1-(フェニルエチル)プロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを
10 白色固体として得た。

- ((1S) - 1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルの代わりに((1S) - 3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソ-1-(フェニルエチル)プロピル)カルバミン酸1, 1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例16(6)と同様の反応を行い、(3S) - 3-アミノ-N-シクロプロピル-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタナミド塩酸塩を白色固体として得た。
15

- 融点: 140. 2-141. 3°C. ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ
20 0. 46-0. 64 (m, 4H) , 1. 64-1. 99 (m, 2H) , 2. 54-2. 78 (m, 3H) , 3. 35 (m, 1H) , 4. 13 (b r s, 0. 5H) , 4. 26 (b r s, 0. 5H) , 6. 37 (b r s, 0. 5H) , 6. 51 (b r s, 0. 5H) , 7. 17-7. 33 (m, 5H) , 8. 05 (b r s, 1. 5H) , 8. 15 (d, 0. 5H, J=4. 5) , 8. 20 (d, 0. 5H, J=4. 8) , 8. 27
25 (b r s, 1. 5H) .

[参考例18]

(3S) - 3-アミノ-2-ヒドロキシ-5-メチル-N-(2-フェノキシエチル)
ヘキサナミド塩酸塩

(1) L-フェニルアラニノールの代わりにL-ロイシノールを用いて、参考例8

5 (1) と同様の反応を行い、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ロイシノール(70g, 84%)を無色オイル状物として得た。

(2) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニノールの代わりにN-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ロイシノールを用いて参考例8(2)と同様の反応を行い、N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ロイシノールを無
10 色オイル状物として得た。

(3) N-(tert-ブトキシカルボニル)-L-フェニルアラニノールの代わりにN-(tert-ブトキシカルボニル)-L-ロイシノールを用いて参考例8(3),

(4) と同様の反応を行い、(3S)-3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシ-5-メチルヘキサノ酸を無色オイル状物として得た。

15 (4) (3S)-3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシ-4-フェニル酪酸の代わりに(3S)-3-(tert-ブトキシカルボニルアミノ)-2-ヒドロキシ-5-メチルヘキサノ酸を用い、エチルアミン水溶液の代わりに2-フェノキシエチルアミンを用いて参考例8(5)と同様の反応を行い、((1S)-2-ヒドロキシ-1-(2-メチルプロピル)-3-オキソ-3-(2-フェノキシエチル)アミノプロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを無色オイル状物
20 として得た。

(5) ((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルの代わりに((1S)-2-ヒドロキシ-1-(2-メチルプロピル)-3-オキソ-3-(2-フェノキシエチル)アミノプロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8

25 (6) と同様の反応を行い、表題化合物を白色固体として得た。

融点：93.6–96.2°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.

7.1–0.89 (m, 6H), 1.35–1.47 (m, 2H), 1.72 (m, 1H), 3.48–3.54 (m, 4H), 4.00–4.07 (m, 2H), 4.12 (d, 0.5H, $J=3.6$), 4.33 (d, 0.5H, $J=1.8$), 6.91–6.96 (m, 3H), 7.27–7.32 (m, 2H), 7.95 (br s, 1.5H), 8.19–8.29 (m, 2.5H).

[参考例19]

3-アミノ-2-ヒドロキシ-5-フェニルペンタナミド塩酸塩

10

エチルアミン水溶液の代わりにアンモニアガスを用いて参考例8(5)と同様の反応を行い、(1-ベンジル-3-アミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを白色固体として得た。

15 ((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルの代わりに(1-ベンジル-3-アミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)カルバミン酸1,1-ジメチルエチルエステルを用いて参考例8(6)と同様の反応を行い、表題化合物を白色固体として得た。

20 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 2.82 (m, 1H), 2.93 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 3.85 (m, 0.5H), 4.26 (m, 0.5H), 6.48 (d, 0.5H, $J=4.8$), 6.75 (d, 0.5H, $J=5.7$), 7.24–7.35 (m, 5H), 7.52 (m, 2H), 8.04 (br s, 1.5H), 8.17 (br s, 1.5H).

25 [参考例20]

N-((2-(ピリジン-2-イル)エチル)カルボニル)-L-ロイシンN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(1) (S) - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりに (2 - ピリジル) エタノールを用いて参考例 2 (1) と同様の反応を行い、N - スクシンイミジル 2 - (ピリジン - 2 - イル) エチルカルボナートを褐色オイル状物として得た。

5 (2) N - スクシンイミジル (3 S) - 3 - テトラヒドロフラニルカルボナートの代わりに N - スクシンイミジル 2 - (ピリジン - 2 - イル) エチルカルボナートを用いて参考例 2 (2) と同様の反応を行い、N - ((2 - (ピリジン - 2 - イル) エチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。

10 (3) N - (((3 S) - テトラヒドロフラン - 3 - イルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンエチルエステルの代わりに N - ((2 - (ピリジン - 2 - イル) エチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンエチルエステルを用いて参考例 2 (3) と同様の反応を行い、N - ((2 - (ピリジン - 2 - イル) エチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンを白色固体として得た。

(4) N - ((2 - メトキシエトキシ) カルボニル) - L - ロイシンの代わりに N - ((2 - (ピリジン - 2 - イル) エチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンを用いて
15 参考例 1 (2) と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.82-0.91 (m, 6H),
1.42-1.76 (m, 3H), 2.76-2.81 (m, 4H), 3.00-3.
06 (m, 2H), 4.30-4.40 (m, 3H), 7.23 (dd, 1H, $J=7.$
20 1, 5.3), 7.30 (d, 1H, $J=7.8$), 7.71 (m, 1H), 7.90
(d, 1H, $J=8.1$), 8.50 (d, 1H, $J=4.5$).

[参考例 21]

N - ((2 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) エチルオキシ) カルボニル) - L - ロ
25 イシン N - ヒドロキシスクシンイミドエステル

(1) (S) - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりに 2 - (6 - メチル - 2 - ピリジル) エタノールを用いて参考例 2 (1) と同様の反応を行い、N - スクシンイ

ミジル 2- (6-メチルピリジン-2-イル) エチルカルボナートを褐色オイル状物として得た。

(2) N-スクシンイミジル (3S) -3-テトラヒドロフラニルカルボナートの代わりにN-スクシンイミジル 2- (6-メチルピリジン-2-イル) エチルカルボナ-

5 トを用いて参考例 2 (2) と同様の反応を行い、N- ((2- (6-メチルピリジン-2-イル) エチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。

(3) N- (((3S) -テトラヒドロフラン-3-イルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンエチルエステルの代わりにN- ((2- (6-メチルピリジン-2-イル)

10 エチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンエチルエステルを用いて参考例 2 (3) と同様の反応を行い、N- ((2- (6-メチルピリジン-2-イル) エチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンを無色オイル状物として得た。

(4) N- ((2-メトキシエチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンの代わりにN- ((2- (6-メチルピリジン-2-イル) エチルオキシ) カルボニル) -L-ロ-

15 イシンを用いて参考例 1 (2) と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.83-0.92 (m, 6H),
1.49-1.77 (m, 3H), 2.43 (s, 3H), 2.81 (s, 4H), 2.
20 99 (t, 2H, J=6.5), 4.29-4.42 (m, 3H), 7.07-7.0
9 (m, 2H), 7.58 (t, 1H, J=7.7), 7.91 (d, 1H, J=8.
4) .

[参考例 22]

25 N- ((2- (5-エチルピリジン-2-イル) エチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(1) (S) - 3-ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりに (5-エチルピリジン-2-イル) エタノールを用いて参考例 2 (1) と同様の反応を行い、N-スクシンイミジル 2- (5-エチルピリジン-2-イル) エチルカルボナートを褐色オイル状物として得た。

5 (2) N-スクシンイミジル (3S) - 3-テトラヒドロフランカルボナートの代わりにN-スクシンイミジル 2- (5-エチルピリジン-2-イル) エチルカルボナートを用いて参考例 2 (2) と同様の反応を行い、N- ((2- (5-エチルピリジン-2-イル) エチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。

10 (3) N- (((3S) -テトラヒドロフラン-3-イルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンエチルエステルの代わりにN- ((2- (5-エチルピリジン-2-イル) エチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンエチルエステルを用いて参考例 2 (3) と同様の反応を行い、N- ((2- (5-エチルピリジン-2-イル) エチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンを無色オイル状物として得た。

15 (4) N- ((2-メトキシエトキシ) カルボニル) -L-ロイシンの代わりにN- ((2- (5-エチルピリジン-2-イル) エチルオキシ) カルボニル) -L-ロイシンを用いて参考例 1 (2) と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

20 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.75-0.92 (m, 6H),
1.12-1.25 (m, 3H), 1.36-1.72 (m, 3H), 2.54-2.
63 (m, 2H), 2.81-2.83 (m, 4H), 2.96-3.02 (m, 2
H), 4.04 (m, 1H), 4.29-4.37 (m, 2H), 7.21 (d, 1H,
J=7.8), 7.53 (m, 1H), 7.90 (d, 1H, J=7.8), 8.34
25 (m, 1H).

[参考例 23]

N-((2-tert-ブトキシエチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(1) (S)-3-ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりにエチレングリコールtert-ブチルエーテルを用いて参考例2(1)と同様の反応を行い、N-スクシンイミジル2-tert-ブトキシエチルカルボナートを無色オイル状物として得た。

(2) N-スクシンイミジル(3S)-3-テトラヒドロフランカルボナートの代わりにN-スクシンイミジル2-tert-ブトキシエチルカルボナートを用いて参考例2(2)と同様の反応を行い、N-((2-tert-ブトキシエチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。

(3) N-(((3S)-テトラヒドロフラン-3-イルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルの代わりにN-((2-tert-ブトキシエチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンエチルエステルを用いて参考例2(3)と同様の反応を行い、N-((2-tert-ブトキシエチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンを無色オイル状物として得た。

(4) N-((2-メトキシエチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンの代わりにN-((2-tert-ブトキシエチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンを用いて参考例1(2)と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.89 (d, 3H, $J=6.3$), 0.92 (d, 3H, $J=6.3$), 1.13 (s, 9H), 1.61 (m, 1H), 1.74 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 3.48 (t, 2H, $J=4.7$), 4.04 (m, 2H), 4.40 (m, 1H), 8.00 (d, 1H, $J=7.8$).

[参考例24]

N-((2-イソプロポキシエチルオキシ)カルボニル)-L-ロイシンN-ヒドロキシスクシンイミドエステル

(1) (S) - 3 - ヒドロキシテトラヒドロフランの代わりにエチレングリコールイソプロピルエーテルを用いて参考例 2 (1) と同様の反応を行い、N - スクシンイミジル 2 - イソプロポキシエチルカルボナートを無色オイル状物として得た。

5 (2) N - スクシンイミジル (3 S) - 3 - テトラヒドロフラニルカルボナートの代わりに N - スクシンイミジル 2 - イソプロポキシエチルカルボナートを用いて参考例 2 (2) と同様の反応を行い、N - ((2 - イソプロポキシエチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンエチルエステルを無色オイル状物として得た。

10 (3) N - (((3 S) - テトラヒドロフラン - 3 - イルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンエチルエステルの代わりに N - ((2 - イソプロポキシエチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンエチルエステルを用いて参考例 2 (3) と同様の反応を行い、N - ((2 - イソプロポキシエチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンを無色オイル状物として得た。

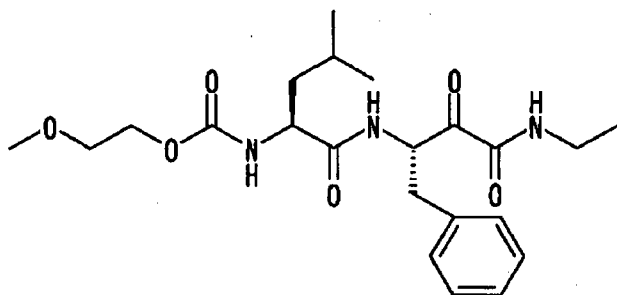
15 (4) N - ((2 - メトキシエチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンの代わりに N - ((2 - イソプロポキシエチルオキシ) カルボニル) - L - ロイシンを用いて参考例 1 (2) と同様の反応を行い、表題化合物を無色オイル状物として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.89 (d, 3H, $J=6.6$), 0.92 (d, 3H, $J=6.3$), 1.08 (d, 6H, $J=6.3$), 1.61 (m, 1H), 1.74 (m, 2H), 2.81 (s, 4H), 3.53 (m, 2H), 20 3.57 (m, 1H), 4.07 (m 2H), 4.40 (m, 1H), 8.02 (d, 1H, $J=7.8$).

[製造例 1]

25 ((1 S) - 1 - (((1 S) - 1 - ベンジル - 2, 3 - ジオキソ - 3 - (エチルアミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) - 3 - メチルブチル) カルバミン酸 2 - メトキシエチルエステル (化合物 1)

[化 51]



参考例1の化合物 (1.2 g, 3.6 mmol) と参考例8の化合物 (1.0 g, 4.0 mmol) のDMF溶液にトリエチルアミン (1.1 g, 11 mmol) を加えた。この溶液を室温で18時間攪拌し、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチルで溶解し、この溶液を1M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮した。得られた固体を酢酸エチル/ヘキサン (1:9) 混液で洗浄し ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル (0.75 g, 47%) を白色固体として得た。

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル (0.7 g, 1.6 mmol) のジクロロメタン (70 mL) 溶液にデス・マーチン試薬 (1.0 g, 2.4 mmol) を加えた。この溶液を室温で18時間攪拌した。そこへ、10%チオ硫酸ナトリウム水溶液 (35 mL) と飽和炭酸水素ナトリウム水溶液 (35 mL) を加え、この溶液を室温で30分攪拌した。有機層を分離し、これを1M塩酸、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液及び飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水後、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル/ヘキサン混液で結晶化し表題化合物 (0.62 g, 88%) を無色結晶として得た。

融点: 138.0–138.3°C. $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6)

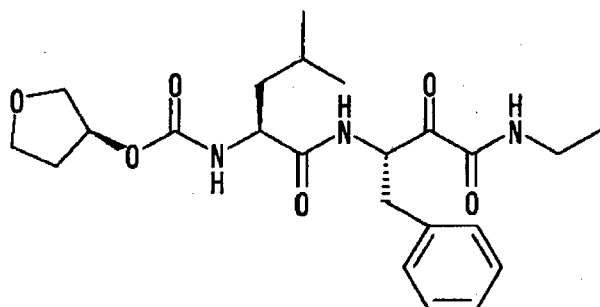
δ 0.83 (d, 3H, $J=7.5$), 0.85 (d, 3H, $J=7.2$), 1.04 (t, 3H, $J=7.1$), 1.35 (m, 2H), 1.56 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 3.14 (m, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.47 (t, 2H, $J=4.5$), 4.04 (m, 3H), 5.19 (m, 1H), 7.16–7.33

(m, 6H), 8.24 (d, 1H, J=7.2), 8.70 (m, 1H). MALDI-TOF-MS: $C_{22}H_{33}N_3O_6$ (M+Na)⁺, 458.2267, 実測値, 458.2361.

5 [製造例2]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(エチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステル(化合物2)

[化52]

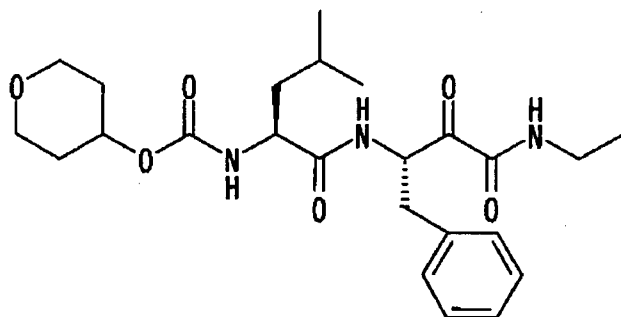


- 10 参考例1の化合物の代わりに参考例2の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。
- 15 融点: 158.9-160.7° C. ¹H-NMR (300MHz, DMSO-d₆)
 δ 0.83 (d, 3H, J=6.6), 0.85 (d, 3H, J=6.9), 1.04 (t, 3H, J=7.1), 1.35 (m, 2H), 1.55 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 3.14 (m, 3H), 3.61-3.78 (m, 4H), 4.01 (m, 1H), 5.07 (m, 1H), 5.19 (m, 1H), 7.17-7.33 (m, 6H), 8.22 (d, 1H, J=7.2), 8.69 (t, 1H, J=5.7). MALDI-TOF-MS: $C_{23}H_{33}N_3O_6$ (M+H)⁺, 448.2447, 実測値, 448.2509.
- 20

〔製造例3〕

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(エチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルエステル (化合物3)

〔化53〕



参考例1の化合物の代わりに参考例3の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

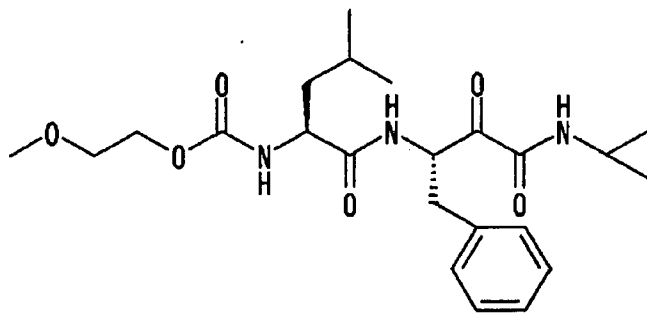
融点：140.0-141.8°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6)

δ 0.84 (m, 6H), 1.04 (t, 3H, $J=7.2$), 1.35 (m, 2H), 1.49 (m, 3H), 1.79 (m, 2H), 2.82 (m, 1H), 3.14 (m, 3H), 3.41 (m, 2H), 3.78 (m, 2H), 4.02 (m, 1H), 4.66 (m, 1H), 5.19 (m, 1H), 7.15-7.33 (m, 6H), 8.22 (d, 1H, $J=7.2$), 8.69 (t, 1H, $J=5.7$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{Na}^+$), 484.2424, 実測値, 484.2486.

〔製造例4〕

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル(化合物4)

[化54]



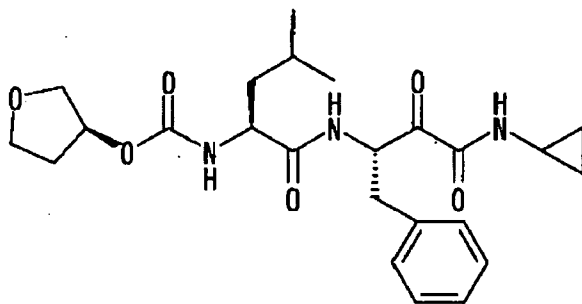
5 参考例8の化合物の代わりに参考例9の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

10 融点: 112.4-113.5°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6)
 δ 0.58 (m, 2H), 0.65 (m, 2H), 0.83 (d, 3H, $J=6.6$), 0.85 (d, 3H, $J=6.6$), 1.35 (m, 2H), 1.56 (m, 1H), 2.68-2.88 (m, 2H), 3.11 (m, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.47 (t, 2H, $J=4.5$), 4.04 (m, 3H), 5.17 (m, 1H), 7.17-7.34 (m, 6H), 8.25 (d, 1H, $J=7.2$), 8.73 (d, 1H, $J=4.8$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{23}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 470.2267, 実測値, 470.2441. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}+6.3^\circ$ (c 0.20, DM SO)

20 [製造例5]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステル(化合物5)

[化55]



- 5 参考例1の化合物の代わりに参考例2の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考例9の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

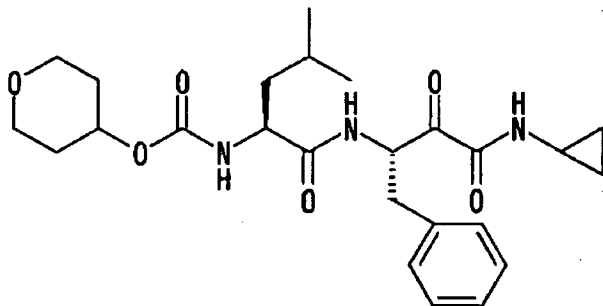
10

融点：169.2-170.5°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6)
 δ 0.58 (m, 2H), 0.65 (m, 2H), 0.83 (d, 3H, $J=8.1$),
 0.85 (d, 3H, $J=6.9$), 1.34 (m, 2H), 1.55 (m, 1H),
 1.83 (m, 1H), 2.08 (m, 1H), 2.79 (m, 2H), 3.12 (m,
 15 1H), 3.61-3.80 (m, 4H), 4.02 (m, 1H), 5.08 (m, 1H),
 5.17 (m, 1H), 7.22-7.35 (m, 6H), 8.24 (d, 1H,
 $J=6.6$), 8.74 (d, 1H, $J=5.1$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 482.2267, 実測値, 482.2586.

20 [製造例6]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルエステル (化合物6)

[化56]



- 5 参考例1の化合物の代わりに参考例3の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考例9の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸テトラヒドロ-4H-ピラン-4-イルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

10

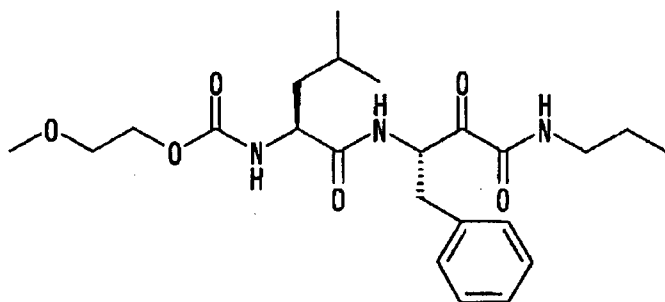
融点：137.0-138.2°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6)
 δ 0.58 (m, 2H), 0.65 (m, 2H), 0.84 (m, 6H), 1.35 (m, 2H), 1.48 (m, 3H), 1.80 (m, 2H), 2.79 (m, 2H), 3.11 (m, 1H), 3.41 (m, 2H), 3.79 (m, 2H), 4.03 (m, 1H), 4.65 (m, 1H), 5.18 (m, 1H), 7.15-7.30 (m, 6H), 8.23 (d, 1H, $J=6.9$), 8.73 (d, 1H, $J=5.4$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 474.2604, 実測値, 474.2643.

15

20 [製造例7]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(プロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル (化合物7)

[化57]



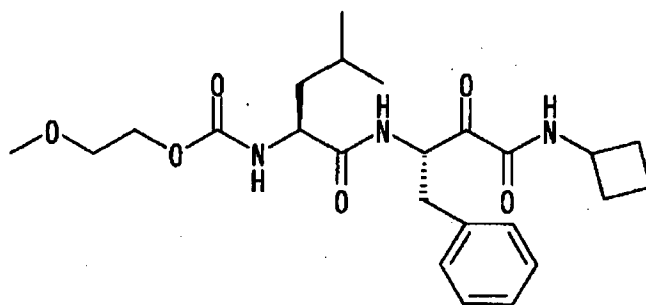
- 5 参考例8の化合物の代わりに参考例10の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-オキソ-3-(プロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

- 10 融点: 108.8-109.9°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6)
 δ 0.83 (m, 9H), 1.35 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.55 (m, 1H), 2.83 (dd, 1H, $J=14.0, 9.2$), 3.08 (m, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.48 (t, 2H, $J=4.4$), 4.04 (m, 3H), 5.19 (m, 1H), 7.22-7.28 (m, 6H), 8.24 (d, 1H, $J=6.9$), 8.68 (t, 1H, $J=5.6$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}^+$), 450.2604, 実測値, 450.2832.
- 15

[製造例8]

- ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロブチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル (化合物8)
- 20

[化58]



参考例 8 の化合物の代わりに参考例 11 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、
 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロブチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン
 酸 2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

5

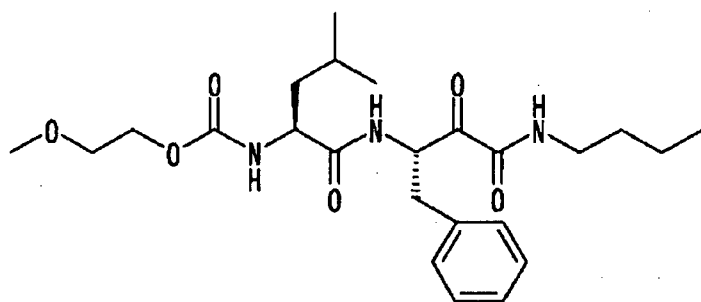
融点：114.2-115.3° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6)
 δ 0.84 (m, 6H), 1.34 (m, 2H), 1.49-1.72 (m, 3H),
 2.10 (m, 4H), 2.81 (dd, 1H, $J=13.8, 9.3$), 3.10
 (m, 1H), 3.25 (s, 3H), 3.47 (m, 2H), 4.03 (m, 3H),
 4.22 (m, 1H), 5.15 (m, 1H), 7.24 (m, 6H), 8.24 (d,
 1H, $J=7.2$), 8.91 (d, 1H, $J=7.8$). MALDI-TOF-M
 S: $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 484.2424, 実測値, 484.2400.

10

[製造例 9]

15 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-ブチルアミノ-2,3-ジオキ
 ソプロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸 2-メトキシエ
 チルエステル (化合物 9)

[化 59]



参考例 8 の化合物の代わりに参考例 12 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、
 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-ブチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

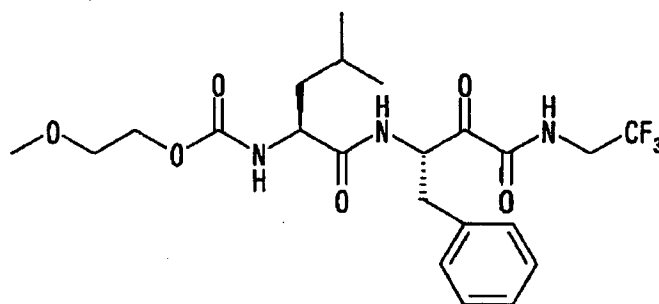
5

融点：94.0-95.2° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.85 (m, 9H), 1.25 (m, 2H), 1.35 (m, 2H), 1.42 (m, 2H), 1.56 (m, 1H), 2.83 (dd, 1H, $J=13.8, 9.0$), 3.10 (m, 3H), 3.25 (s, 3H), 3.47 (t, 2H, $J=4.5$), 4.04 (m, 3H), 5.18 (m, 1H), 7.21-7.29 (m, 6H), 8.23 (d, 1H, $J=6.6$), 8.67 (t, 1H, $J=6.0$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}^+$), 464.2760, 実測値, 464.2870.

15 [製造例10]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(2,2,2-トリフルオロエチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル (化合物10)

[化60]



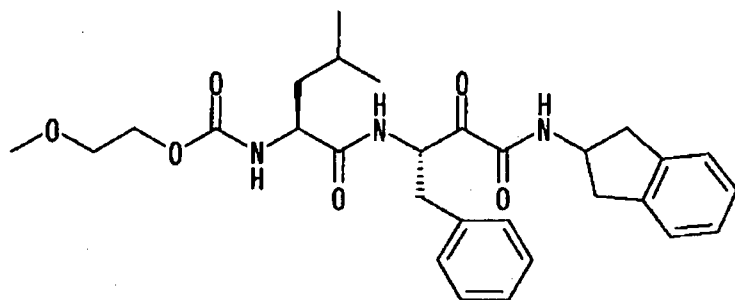
参考例8の化合物の代わりに参考例13の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、
 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-オキソ-3-(2,2,2-トリフルオロエチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点：152.5-153.9° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6)
 δ 0.84 (m, 6H), 1.34 (m, 2H), 1.55 (m, 1H), 2.86 (dd, 1H, $J=14.0, 8.6$), 3.10 (dd, 1H, $J=14.1, 4.8$), 3.25 (s, 3H), 3.48 (t, 2H, $J=4.7$), 3.90 (m, 2H), 4.04 (m, 3H), 5.14 (m, 1H), 7.21-7.31 (m, 6H), 8.34 (d, 1H, $J=6.9$), 9.29 (m, 1H). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 490.2165, 実測値, 490.2434.

[製造例11]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(2-インダニルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル (化合物11)

[化61]



参考例 8 の化合物の代わりに参考例 14 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、
 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-(2-インダニルアミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸 2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

5

融点: 141.9–143.5° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6)

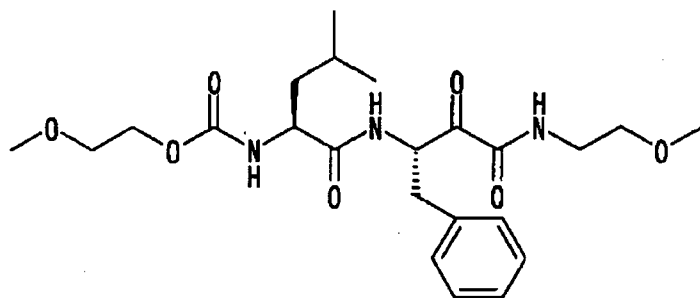
δ 0.83 (d, 3H, $J=6.9$), 0.86 (d, 3H, $J=6.9$), 1.36 (m, 2H), 1.57 (m, 1H), 2.80–2.96 (m, 3H), 3.10–3.18 (m, 3H), 3.24 (s, 3H), 3.47 (t, 2H, $J=4.7$),

10 4.04 (m, 3H), 4.50 (m, 1H), 5.19 (m, 1H), 7.13–7.30 (m, 10H), 8.29 (d, 1H, $J=6.9$), 8.97 (d, 1H, $J=7.2$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{29}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 524.2760, 実測値, 524.2810.

15 [製造例 12]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(2-メトキシエチルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸 2-メトキシエチルエステル (化合物 12)

[化 62]



参考例 8 の化合物の代わりに参考例 15 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、
 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-(2-メトキシエチルアミノ)-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル
 カルバミン酸 2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

5

融点：127.0-127.9° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6)
 δ 0.83 (d, 3H, $J=6.9$), 0.86 (d, 3, $J=6.9$), 1.35
 (m, 2H), 1.56 (m, 1H), 2.83 (dd, 1H, $J=13.8, 9.0$), 3.11 (dd, 1H, $J=14.0, 4.4$), 3.24 (s, 3H), 3.
 25 (s, 3H), 3.16-3.34 (m, 2H), 3.39 (m, 2H), 3.4
 8 (t, 2H, $J=4.5$), 4.04 (m, 3H), 5.20 (m, 1H), 7.1
 8-7.30 (m, 6H), 8.21 (d, 1H, $J=6.9$), 8.66 (t, 1H,
 $J=5.4$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 488.
 2373, 実測値, 488.2680.

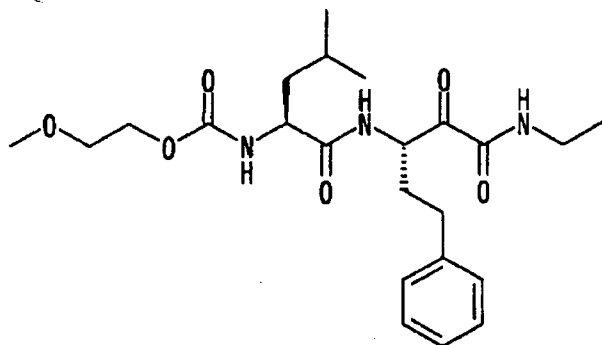
15

[製造例 13]

((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-3-エチルアミノ-1-(フェ
 ニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸 2-
 メトキシエチルエステル (化合物 13)

20

[化 63]



参考例8の化合物の代わりに参考例16の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、

((1S)-1-(((1S)-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソ-1-(フェニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバ

5 ミン酸2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点：119.1-120.4°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6)

δ 0.89 (t, 6H, $J=6.3$), 1.03 (t, 3H, $J=7.2$), 1.43 (t, 2H, $J=7.2$), 1.61-1.85 (m, 2H), 2.07 (m, 1H),

10 2.56-2.74 (m, 2H), 3.07-3.17 (m, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.49 (t, 2H, $J=4.7$), 4.05-4.14 (m, 3H), 4.

89 (m, 1H), 7.16-7.36 (m, 5H), 7.34 (d, 1H, $J=8.$

4), 8.33 (d, 1H, $J=6.9$), 8.65 (t, 1H, $J=5.9$). MA

LDI-TOF-MS: $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 450.2604, 実測値, 4

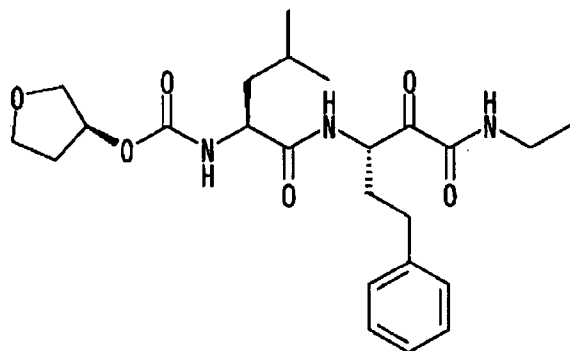
15 50.2701.

[製造例14]

((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-3-エチルアミノ-1-(フェニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3

20 S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステル(化合物14)

[化64]



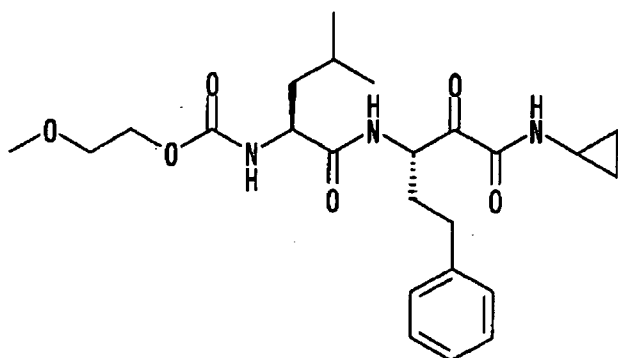
参考例 1 の化合物の代わりに参考例 2 の化合物を、参考例 8 の化合物の代わりに参考例 16 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-3-エチルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソ-1-(フェニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点：111.9-114.5° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6)
 δ 0.89 (t, 6H, $J=6.3$), 1.03 (t, 3H, $J=7.2$), 1.43 (t, 2H, $J=7.4$), 1.60-1.91 (m, 3H), 2.09 (m, 2H),
 10 2.56-2.76 (m, 2H), 3.07-3.17 (m, 2H), 3.63-3.82 (m, 4H), 4.02-4.13 (m, 1H), 4.88 (m, 1H), 5.09-5.13 (m, 1H), 7.16-7.31 (m, 5H), 7.34 (d, 1H, $J=8.4$), 8.34 (d, 1H, $J=6.9$), 8.66 (t, 1H, $J=5.7$).
 15 MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 462.2604, 実測値, 462.2870.

[製造例 15]

((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-3-シクロプロピルアミノ-1-(フェニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル (化合物 15)

[化 65]



参考例 8 の化合物の代わりに参考例 17 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、
 ((1 S) - 1 - (((1 S) - 3 - シクロプロピルアミノ - 2 - ヒドロキシ - 3 -
 オキソ - 1 - (フェニルエチル) プロピル) アミノ) カルボニル) - 3 - メチルブチ
 ル) カルバミン酸 2 - メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

5

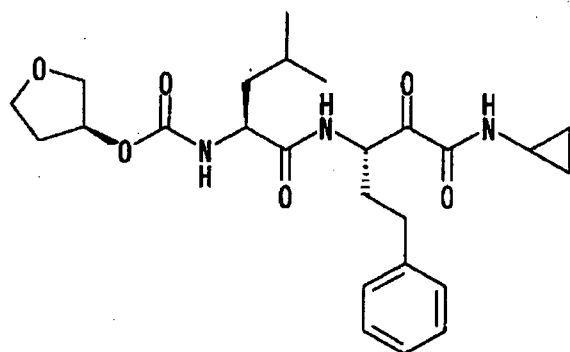
融点: 109.7—111.1° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6)

δ 0. 53–0. 68 (m, 4H) , 0. 87–0. 91 (m, 6H) , 1. 43 (t, 3H, J=7. 2) , 1. 59–1. 85 (m, 2H) , 2. 01–2. 13 (m, 1H) , 2. 56–2. 74 (m, 3H) , 3. 25 (s, 3H) , 3. 48–3. 51 (m, 2H) , 4. 05–4. 14 (m, 3H) , 4. 87 (m, 1H) , 7. 17–7. 36 (m, 6H) , 8. 34 (d, 1H, J=6. 6) , 8. 69 (d, 1H, J=5. 1) . MALDI-TOF-MS : $C_{24}H_{35}N_3O_6$ (M+H)⁺, 462. 2604, 実測値, 462. 2742.

15 [製造例 16]

((1S) -1- ((((1S) -2, 3-ジオキソ-3-シクロプロピルアミノ-1-
- (フェニルエチル) プロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミ
ン酸 (3S) -テトラヒドロフラン-3-イルエステル (化合物16)

[化 6 6]



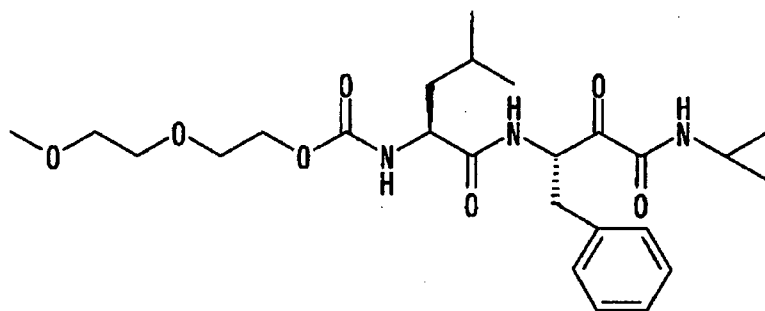
参考例1の化合物の代わりに参考例2の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考例17の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソ-1-(フェニルエチル)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸(3S)-テトラヒドロフラン-3-イルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点：115.8-116.2° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6)
 δ 0.56-0.59 (m, 4H), 0.88 (t, 6H, $J=6.3$), 1.42 (t, 2H, $J=7.4$), 1.60-1.91 (m, 3H), 2.09 (m, 2H),
 2.56-2.76 (m, 3H), 3.63-3.81 (m, 4H), 4.05-4.13 (m, 1H), 4.87 (m, 1H), 5.09-5.13 (m, 1H), 7.20-7.35 (m, 6H), 8.34 (d, 1H, $J=6.9$), 8.69 (d, 1H, $J=5.1$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{O}_6$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 474.2604, 実測値, 474.2598.

[製造例17]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル (化合物17)

[化67]



参考例 1 の化合物の代わりに参考例 4 の化合物を、参考例 8 の化合物の代わりに参考例 9 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペン

5 チルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

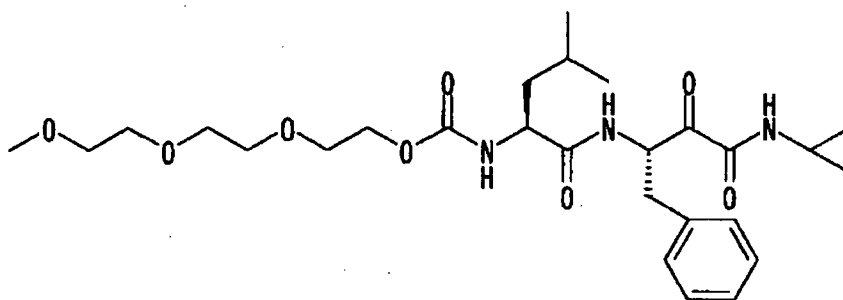
融点：127.9-128.7°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6)

δ 0.54-0.66 (m, 4H), 0.81-0.86 (m, 6H), 1.30-1.42 (m, 2H), 1.57 (m, 1H), 2.73 (m, 1H), 2.82 (dd, 1H, $J=14.3, 9.2$), 3.11 (dd, 1H, $J=13.8, 4.2$), 3.24 (s, 3H), 3.42-3.44 (m, 2H), 3.50-3.57 (m, 4H), 3.99-4.04 (m, 3H), 5.17 (m, 1H), 7.22-7.30 (m, 6H), 8.22 (d, 1H, $J=6.9$), 8.71 (d, 1H, $J=4.8$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_7$ ($\text{M}+\text{Na}$)⁺, 514.2530, 15 実測値, 514.2944. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}+13.9^\circ$ (c 0.20, DMSO)

[製造例 18]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸8-15
18-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルエステル (化合物 18)

[化 68]



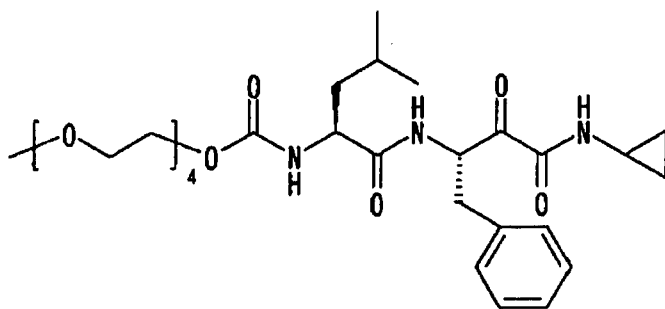
参考例 1 の化合物の代わりに参考例 5 の化合物を、参考例 8 の化合物の代わりに参考例 9 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸 8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点: 116.0-117.2° C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6)
 δ 0.58 (m, 2H), 0.65 (m, 2H), 0.83 (d, 3H, $J=7.8$),
 0.85 (d, 3H, $J=6.9$), 1.35 (m, 2H), 1.57 (m, 1H),
 2.73-2.86 (m, 2H), 3.11 (m, 1H), 3.24 (s, 3H), 3.44 (m, 2H), 3.51 (m, 6H), 3.56 (t, 2H, $J=4.7$), 4.04 (m, 3H), 5.17 (m, 1H), 7.22-7.31 (m, 6H), 8.25 (d, 1H, $J=6.9$), 8.73 (d, 1H, $J=5.1$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 558.2792, 実測値, 558.2717. $[\alpha]_D^{25}+2.5^\circ$ (c 0.20, DMSO)

[製造例 19]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸 1-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルエステル (化合物 19)

[化 69]



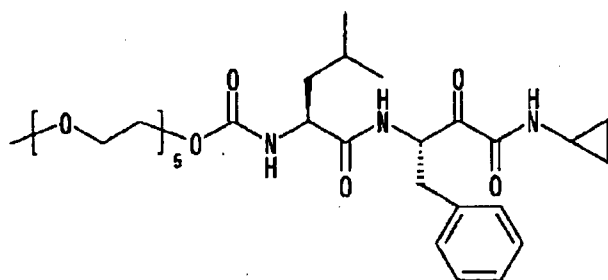
参考例 1 の化合物の代わりに参考例 6 の化合物を、参考例 8 の化合物の代わりに参考例 9 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸 11-メトキシ-3, 6, 9-トリオキサウンデカニルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点：97.5-98.5°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.54-0.66 (m, 4H), 0.81-0.86 (m, 6H), 1.32-1.37 (m, 2H), 1.56 (m, 1H), 2.73 (m, 1H), 2.82 (dd, 1H, $J=14.0, 9.2$), 3.11 (dd, 1H, $J=14.1, 4.2$), 3.24 (s, 3H), 3.41-3.44 (m, 2H), 3.50-3.51 (m, 10H), 3.54-3.57 (m, 2H), 3.99-4.08 (m, 3H), 5.16 (m, 1H), 7.22-7.31 (m, 6H), 8.25 (d, 1H, $J=7.2$), 8.73 (d, 1H, $J=5.1$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{29}\text{H}_{45}\text{N}_3\text{O}_9$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 602.3054, 実測値, 602.3427. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}+6.9^\circ$ (c 0.20, DMSO)

[製造例 20]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2, 3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸 14-メトキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカニルエステル (化合物 20)

[化 70]



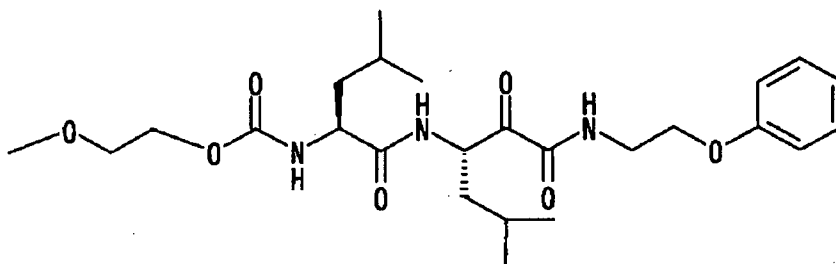
参考例 1 の化合物の代わりに参考例 7 の化合物を、参考例 8 の化合物の代わりに参考例 9 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-シクロプロピルアミノ-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸14-メトキシ-3, 6, 9, 12-テトラオキサテトラデカニルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点：98.5-99.9°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.58 (m, 2H), 0.65 (m, 2H), 0.83 (d, 3H, $J=6.9$), 0.85 (d, 3H, $J=7.8$), 1.35 (m, 2H), 1.57 (m, 1H), 2.73-2.86 (m, 2H), 3.11 (m, 1H), 3.24 (s, 3H), 3.42 (m, 2H), 3.51 (m, 14H), 3.56 (t, 2H, $J=3.3$), 4.04 (m, 3H), 5.17 (m, 1H), 7.22-7.30 (m, 6H), 8.24 (d, 1H, $J=6.9$), 8.72 (d, 1H, $J=4.5$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{31}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_{10}$ ($\text{M}+\text{Na}$) $^+$, 646.3316, 実測値, 646.3404.

[製造例 21]

((1S)-1-(((1S)-2, 3-ジオキソ-1-(2-メチルプロピル)-3-(2-フェノキシエチル)アミノプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-メトキシエチルエステル (化合物 21)

[化 71]



参考例 8 の化合物の代わりに参考例 18 の化合物を用いて製造例 1 と同様の反応を行い、

((1S)-1-(((1S)-2-ヒドロキシ-1-(2-メチルプロピル)-3-オキソ-3-(2-フェノキシエチル) アミノプロピル) アミノ) カルボニル)-3-メチルブチル) カルバミン酸 2-メトキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結

5 晶として得た。

融点：99.7-100.5°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ

0.88 (dd, 12H, $J=12.0, 6.3$), 1.35-1.54 (m, 4H),

1.58-1.75 (m, 2H), 3.25 (s, 3H), 3.46-3.53 (m,

10 4H), 4.03-4.07 (m, 5H), 5.06 (m, 1H), 6.91-6.9

5 (m, 3H), 7.26-7.31 (m, 3H), 8.15 (d, 1H, $J=7.$

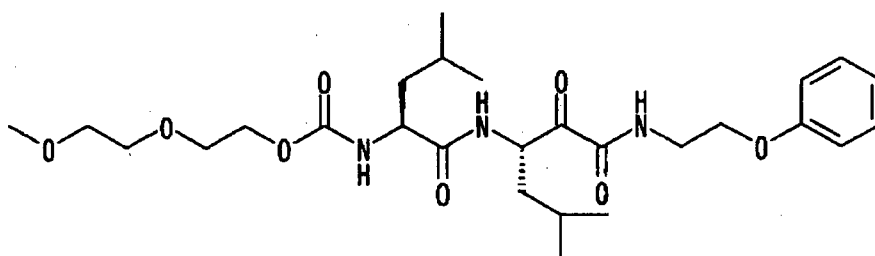
2), 8.81 (t, 1H, $J=5.9$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_3$

O_7 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 494.2866, 実測値, 494.2967.

15 [製造例 22]

((1S)-1-(((1S)-2,3-ジオキソ-1-(2-メチルプロピル)-3-(2-フェノキシエチル) アミノプロピル) アミノ) カルボニル)-3-メチルブチル) カルバミン酸 5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル (化合物 22)

[化 72]



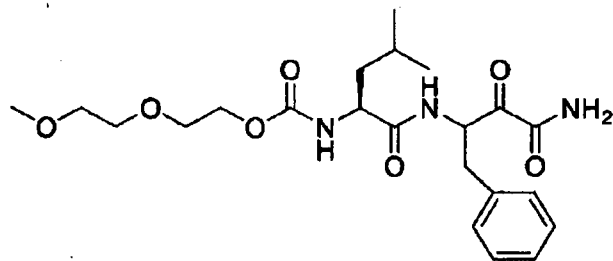
参考例1の化合物の代わりに参考例4の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考例18の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-2-ヒドロキシ-1-(2-メチルプロピル)-3-オキソ-3-(2-フェノキシエチル)アミノプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点: 53.3-54.1°C. $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.87 (dd, 12H, $J=12.2, 6.5$), 1.35-1.54 (m, 4H), 1.58-1.75 (m, 2H), 3.24 (s, 3H), 3.41-3.45 (m, 2H), 3.47-3.57 (m, 6H), 4.03-4.07 (m, 5H), 5.06 (m, 1H), 6.91-6.96 (m, 3H), 7.26-7.31 (m, 3H), 8.17 (d, 1H, $J=6.9$), 8.83 (t, 1H, $J=5.7$). MALDI-TOF-MS: $\text{C}_{27}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_8$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, 538.3128, 実測値, 538.3140.

15

[製造例23]

((1S)-1-(((1RS)-3-アミノ-1-ベンジル-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル (化合物23)



20

[化73]

参考例1の化合物の代わりに参考例4の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考例19の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1RS)-3-アミノ-1-ベンジル-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

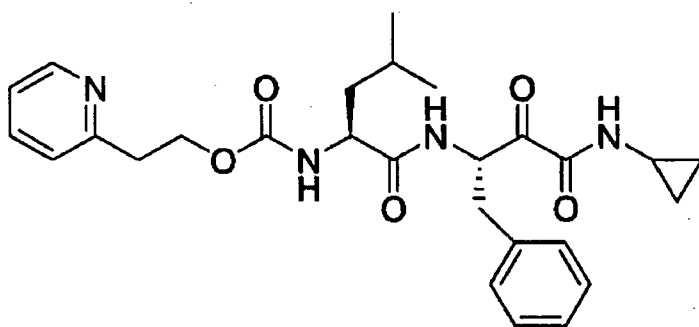
ルボニル) - 3-メチルブチル) カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.77 (d, 3H, $J=6.3$),
 5 0.83 (d, 1.5H, $J=6.6$), 0.86 (d, 1.5H, $J=6.9$), 1.
 05-1.63 (m, 3H), 2.68-2.85 (m, 1H), 3.12 (m, 1
 H), 3.23 (s, 3H), 3.42 (m, 2H), 3.51-3.56 (m, 4
 H), 4.03 (m, 3H), 5.22 (m, 1H), 7.21-7.31 (m, 6
 H), 7.81 (d, 1H, $J=14$), 8.06 (d, 1H, $J=18$), 8.19
 10 (d, 0.5H, $J=6.9$), 8.26 (d, 0.5H, $J=7.5$).

[製造例24]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,
 3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-
 15 (ピリジン-2-イル)エチルエステル(化合物24)

[化74]



参考例1の化合物の代わりに参考例20の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考
 例9の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-
 20 S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2-ヒドロキシ-3-オキソプロ
 ロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(ピリジン-2-
 -イル)エチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.58–0.66 (m, 4H),
 0.83 (t, 6H, $J=7.1$), 1.31–1.35 (m, 2H), 1.53 (m,
 1H), 2.74 (m, 1H), 2.81 (dd, 1H, $J=14.1, 9.3$), 3.
 5 02 (t, 2H, $J=6.3$), 3.11 (dd, 1H, $J=14.0, 4.1$), 4.
 01 (m, 1H), 4.28–4.32 (m, 2H), 5.17 (m, 1H), 7.1
 4–7.34 (m, 8H), 7.75 (t, 1H, $J=6.8$), 8.23 (d, 1H,
 $J=7.2$), 8.51 (d, 1H, $J=4.2$), 8.71 (d, 1H, $J=4.$
 5).

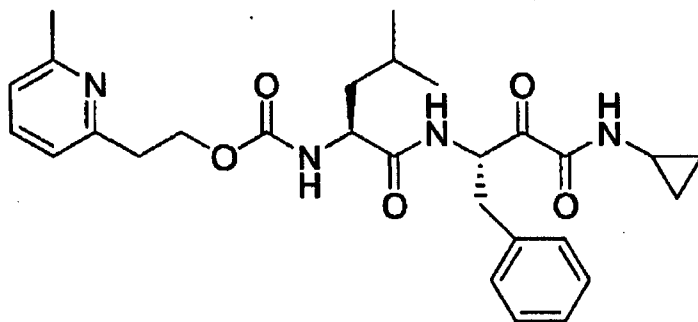
10

[製造例25]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,
 3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-
 (6-メチルピリジーン-2-イル)エチルエステル (化合物25)

15

[化75]



参考例1の化合物の代わりに参考例21の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考
 例9の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、(((1S)-1-(((1S)-1-
 S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2-ヒドロキシ-3-オキソプ
 ロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(6-メチルピ
 20 リジーン-2-イル)エチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

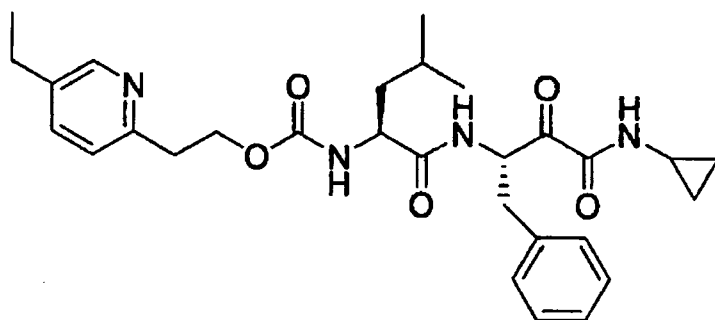
融点：162.0–163.6℃.

$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.54–0.66 (m, 4H),
 0.76–0.86 (m, 6H), 1.54 (m, 1H), 2.43 (s, 3H), 2.
 73–2.86 (m, 2H), 2.96 (t, 2H, $J=6.5$), 3.11 (m, 1
 H), 4.03 (m, 1H), 4.21–4.34 (m, 2H), 5.17 (m, 1
 5 H), 7.07–7.30 (m, 8H), 7.58 (t, 1H, $J=7.7$), 8.2
 3 (d, 1H, $J=6.9$), 8.72 (d, 1H, $J=4.8$).

[製造例26]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,
 10 3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-
 (5-エチルピリジン-2-イル)エチルエステル(化合物26)

[化76]



参考例1の化合物の代わりに参考例22の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考
 例9の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、((1S)-1-(((1S)-1-
 15 S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2-ヒドロキシ-3-オキソプ
 ロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(5-エチルピ
 リジン-2-イル)エチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

融点：119.9–121.0°C.

20

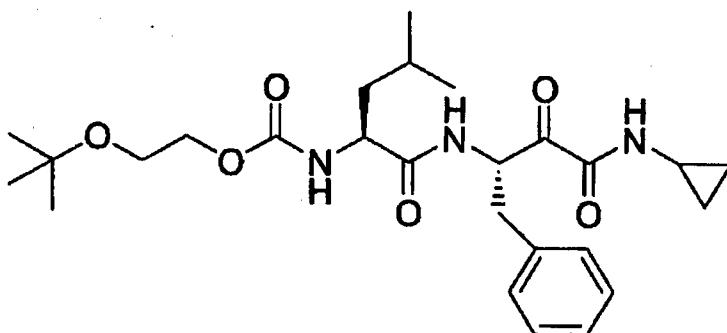
$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO-d_6) δ 0.58–0.66 (m, 4H),
 0.75–0.85 (m, 6H), 1.17 (t, 3H, $J=7.7$), 1.33–1.

36 (m, 2H), 1.53 (m, 1H), 2.58 (dd, 2H, $J=15.5, 8.3$), 2.74–2.85 (m, 2H), 2.94–2.98 (m, 2H), 3.12 (m, 1H), 4.04 (m, 1H), 4.28–4.29 (m, 2H), 5.17 (m, 1H), 7.13–7.26 (m, 7H), 7.55 (d, 1H, $J=8.1$), 5 8.22–8.35 (m, 2H), 8.75 (m, 1H).

[製造例27]

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2, 3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-
10 tert-ブトキシエチルエステル (化合物27)

[化77]



参考例1の化合物の代わりに参考例23の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考
例9の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、(((1S)-1-(((1
S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2-ヒドロキシ-3-オキソ
15 ロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-tert-ブ
トキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

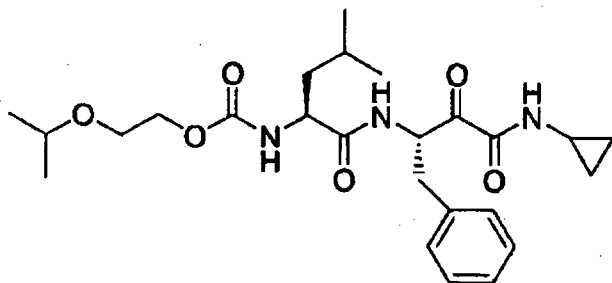
$^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.58 (m, 2H), 0.65 (m, 2H), 0.83 (d, 3H, $J=7.5$), 0.85 (d, 3H, $J=6.9$), 1.12 (s, 9H), 1.35 (m, 2H), 1.57 (m, 1H), 2.7
20 4 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 3.11 (m, 1H), 3.45 (m, 2

H), 3.98 (m, 3H), 5.17 (m, 1H), 7.24 (m, 6H), 8.23 (d, 1H, J=6.6), 8.71 (d, 1H, J=4.8).

〔製造例28〕

- 5 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-イソプロポキシエチルエステル (化合物28)

〔化78〕



- 参考例1の化合物の代わりに参考例24の化合物を、参考例8の化合物の代わりに参考
 10 例9の化合物を用いて製造例1と同様の反応を行い、(((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2-ヒドロキシ-3-オキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-イソプロポキシエチルエステルを経て表題化合物を無色結晶として得た。

- 15 $^1\text{H-NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ 0.58 (m, 2H), 0.65 (m, 2H), 0.83 (d, 3H, J=7.2), 0.85 (d, 3H, J=6.9), 1.07 (d, 6H, J=5.7), 1.35 (m, 2H), 1.57 (m, 1H), 2.74 (m, 1H), 2.82 (m, 1H), 3.12 (m, 1H), 3.50 (m, 2H), 3.55 (m, 1H), 4.01 (m, 3H), 5.17 (m, 1
 20 H), 7.24 (m, 6H), 8.22 (d, 1H, J=6.9), 8.71 (d, 1H, J=3.6).

- μ -及びm-カルパインの阻害活性を文献 (Anal. Biochem., 1993年、第208巻, p. 387-392) に記載された方法に準じて測定した。すなわち、種々の濃度の被験化合物を含むDMSO溶液 ($2.5 \mu\text{L}$) に、 0.5 mg/mL のカゼイン、 50 mM のトリス塩酸緩衝液 ($\text{pH} 7.4$)、 20 mM のジチオスレイトール
- 5 及び 1.0 nmol の μ -カルパイン (ヒト赤血球由来、コスモ・バイオ株式会社製) 又はm-カルパイン (ブタ腎臓由来、コスモ・バイオ株式会社製) を含む反応液 ($200 \mu\text{L}$) を96穴プレート上で加えた。そこへ、 20 mM の塩化カルシウム水溶液 ($50 \mu\text{L}$) を加え、 30°C で60分間反応させた。この反応液 ($100 \mu\text{L}$) を別の96穴プレートに移し、精製水 ($50 \mu\text{L}$) と50%のProtein Assay Dye
- 10 Reagent (バイオラド社製; カタログNo. 500-0006) 水溶液 ($100 \mu\text{L}$) を加えて室温で15分間放置した後、 595 nm で吸光度を測定した。被験化合物を含まず同様に処理したものをコントロール値、 20 mM 塩化カルシウム水溶液の代わりに 1 mM EDTA水溶液 ($50 \mu\text{L}$) を加え同様に処理したものをブランク値とし、下記の式より算出される阻害率を計算し、50%阻害に必要な濃度 (IC_{50}) を
- 15 求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{ 1 - (\text{測定値} - \text{ブランク値}) / (\text{コントロール値} - \text{ブランク値}) \} \times 100$$

- 20 当該濃度 (IC_{50}) を酵素 (カルパイン) 阻害活性 (μM) として、表1に示した。各化合物は μ -カルパイン及びm-カルパインの活性を阻害した。

[表 1]

化合物	酵素阻害活性 (μM)	
	μ -カルバイン	m-カルバイン
化合物 1	0. 1 7	0. 1 1
化合物 2	0. 1 5	0. 1 1
化合物 3	0. 2 5	0. 1 6
化合物 4	0. 1 1	0. 1 0
化合物 5	0. 0 9	0. 0 5
化合物 6	0. 1 2	0. 1 3
化合物 7	0. 1 0	0. 0 7
化合物 8	0. 1 7	0. 0 8
化合物 9	0. 1 0	0. 1 4
化合物 1 0	0. 4 5	0. 3 4
化合物 1 1	0. 1 7	0. 1 2
化合物 1 2	0. 1 8	0. 1 1
化合物 1 3	0. 3 0	0. 2 0
化合物 1 4	0. 1 6	0. 2 0
化合物 1 5	0. 1 8	0. 1 4
化合物 1 6	0. 1 4	0. 1 0
化合物 1 7	0. 1 7	0. 1 0
化合物 1 8	0. 1 9	0. 1 2
化合物 1 9	0. 2 2	0. 1 7
化合物 2 0	0. 4 2	0. 1 9
化合物 2 1	0. 0 8	0. 1 1
化合物 2 2	0. 0 9	0. 1 6
化合物 2 3	0. 1 9	0. 1 8
化合物 2 4	0. 0 2 9	0. 0 1 7

これらの化合物のうち、化合物 1 7 を以下の検討に用いた。化合物 1 7 は SN J - 1 9 4 5 である。以下、化合物 1 7 を SN J - 1 9 4 5 と表記する。

- 5 なお、以下の検討において用いた実験動物や実験細胞は、基本的に上記非特許文献 1 (Masami Yamada et. al., Nature Medicine 1

5, 1202-1207 (2009))と同様にして調製した。また、実験動物を死亡させる場合には、まず致死量のエーテルを用いて麻酔を施し、安楽死させた。また、以下の実験でDAPI染色法を用いる場合があるが、DAPIが核を染色する蛍光色素であることはよく知られている。

5

LIS1遺伝子ヘテロ欠損型マウス (LIS1ヘテロ変異マウス) の作製

LIS1ヘテロ変異マウスは以下の方法で作製した。LIS1のコンディショナルノックアウトマウスとして129S-Pafah1b1^{tm2Awb}/J (The Jackson Laboratory) を使用した。このマウスは、イントロンIIとイントロンVの中にloxP配列を挿入し、Cre-loxPシステムでエクソンIII-エクソンVIを欠失させLIS1を不活化するシステムを有するマウスである。この129S-Pafah1b1^{tm2Awb}/Jの雌をホモ型のEII-Cre形質転換マウス (FVB/N-Tg (EIIa-cre) C5379Lmgd/J、The Jackson Laboratory) の雄と交配し、Cre蛋白質を部分的に反応させることで129S-Pafah1b1^{tm2Awb}/J (The Jackson Laboratory) が持っているES細胞のセレクションに用いたneo遺伝子を除いた。このneo遺伝子を持たない129S-Pafah1b1^{tm2Awb}/Jどうしを交配し、129S-Pafah1b1^{tm2Awb}/Jのホモマウスを作製した。このneo (-) 129S-Pafah1b1^{tm2Awb}/Jホモマウスの雄をFVB/N-Tg (EIIa-cre) C5379Lmgd/J (The Jackson Laboratory) の雌と交配し、LIS1ヘテロ変異マウスを作製した。

野生型マウスは、日本クレア株式会社から購入したFVB/NJclマウスを使用した。

25 SNJ-1945による細胞内のLIS1タンパク質量の変化の検討

LIS1遺伝子ヘテロ欠損あるいは野生型マウス (12.5-14.5日目の胎児) 各々5匹から線維芽細胞 (MEF; mouse embryonic fibroblast) をそれぞれ樹立した。

線維芽細胞は下記の方法により樹立した。妊娠マウスを頸椎脱臼によって殺し、無菌的に直ちにマウス胎児を単離し、ピンセットで頭部および内臓組織を取り除いた後、ハサミでマウス胎児を細かく裁断した。裁断された組織片にT r i p s i n - E D T A (G I B C O , 2 5 2 0 0) 10mlを加えて50mlのプラスチックチューブ (N U N C , 3 7 3 6 8 7) に入れて37℃で30分インキュベーションした。30分インキュベーションした後、10mlのFetal Bovine Serum (EQUITECH-BIO, Inc.、SFBM30-1798)を加え、10mlピペット (N U N C , 1 5 9 6 3 3) でピペッティングし、細胞を単離した。室温で5分間静置した後に上清を回収し、50mlのプラスチックチューブ (N U N C , 3 7 3 6 8 7) に移し替えた後、5分間1000RPMで遠心分離し、上清を捨てた。その後、細胞ペレットをD-MEM (WAKO, 041-29775), 10%相当のFetal Bovine Serum (EQUITECH-BIO, Inc.、SFBM30-1798)と1%相当のL-Glutamine (GIBOCO, 25030)、PenStrep (GIBOCO, 15140)を加えた細胞培養液で10cm細胞培養シャーレ (Greiner bio-one, 664160)で培養した。細胞は3日ごとに10cm細胞培養シャーレ (Greiner bio-one, 664160)をPBSで洗浄した。次いでこの細胞培養シャーレに、1mlのT r i p s i n - E D T A (G I B C O , 2 5 2 0 0) 1mlを加えて37℃で5分インキュベーションして細胞を単離し、D-MEM (WAKO, 041-29775), 10%相当のFetal Bovine Serum (EQUITECH-BIO, Inc.、SFBM30-1798)及び1%相当のL-Glutamine (GIBOCO, 25030)、PenStrep (GIBOCO, 15140)を加えた細胞培養液 (9ml)を加えて10mlピペット (N U N C , 1 5 9 6 3 3) でピペッティングし、10cm細胞培養シャーレ (Greiner bio-one, 664160) 5枚に各々2mlずつ加えた。さらに、この細胞培養シャーレに、D-MEM (WAKO, 041-29775), 10%相当のFetal Bovine Serum (EQUITECH-BIO, Inc.、SFBM30-1798)及び1%相当のL-Glutamine (GIBOCO, 25030)、PenStrep (GIBOCO, 15140)を加えた細胞培養

液 (8ml) を加えて計 10ml の細胞培養液とし、37℃、5% CO₂ の条件で細胞培養器を用いて培養した。

当該細胞を用いて、以下の手順で各細胞において SNJ-1945 が細胞内の LIS タンパク質量にどのように影響するかを検討した。具体的には、次のようにしてウエスタン

- 5 ンブロットを行うことにより検討した。すなわち、調製した線維芽細胞を蛋白質抽出バッファで抽出し (20mM Tris-HCl pH7.5, 100mM NaCl, 5mMEDTA, 0.1 %Triton-X100)、蛋白質を定量し、一レーン当たり 10 μ g の蛋白質をのせ、10%アクリルゲルで分離 (SDS-PAGE) したのちに、Immobilon膜 (Millipore、IPVH00010) に転写し、
- 10 LIS及びDIC (dynein intermediate chain: ダイニン量を反映する) を検出した。なお、 β アクチンは蛋白質量のリファレンスとして利用するため検出した。なお、当該ウエスタンブロットに用いた抗体は以下の通りである。抗 LIS1抗体 (N-19, SC-7577, ヤギポリクローナル抗体、Santa Cruz Biotechnology; 1:100希釈)、抗細胞質ダイニン中鎖抗体
- 15 (74.1, マウスモノクローナル抗体、Millipore; 1:100希釈)、抗 β COP抗体 (マウスモノクローナル抗体、Sigma; 1:100希釈)、抗 β アクチン抗体 (SC-7210, ウサギポリクローナル抗体、Santa Cruz Biotechnology; 1:100希釈)。

- 結果を図1に示す。aに検出されたバンドを、bにバンドのインテンシティーをグラフにしたものを示す。Lis1+/-の細胞ではLISタンパク質量が著しく低下しているのに対し、SNJ-1945で処理したLis1+/-の細胞ではLISタンパク質量の回復がみられた。このことから、SNJ-1945により脳滑症を治療し得ることが示された。

25 SNJ-1945による細胞内のタンパク質局在の変化の検討

LIS1遺伝子ヘテロ欠損あるいは野生型マウス (12.5-14.5日目の胎児) 各々5匹をまとめて一つのグループとし、上述と同様の方法を用いて、線維芽細胞 (MEF; mouse embryonic fibroblast) をそれぞれのグルー

プから樹立した。(すなわち、同じ遺伝子型のマウスをまとめて線維芽細胞を確立した。)当該細胞を用いて、以下の手順で免疫細胞染色を行ない、各細胞においてSNJ-1945が細胞内のタンパク質局在にどのように影響するかを検討した。

まず、6穴プレート(Nunc)にあらかじめ0.1N塩酸で洗浄したスライドガラス(24×24 mm;松浪硝子)を敷き、MEF細胞を 1.0×10^5 細胞/穴になるようにD-MEM培養液(10%ウシ胎児血清を含む, 和光純薬)中に蒔いた。次いで、この6穴プレートを37℃、5%CO₂存在下で一晩培養した後、最終濃度が200 μMになるようにSNJ-1945を添加した。さらに2時間、同条件下でインキュベーションした。

- 10 対照実験として、1%ジメチルスルホキシド(DMSO)を添加し同様の実験を行なった。MEF細胞は、リン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド(WAKO:162-16065)で固定した(室温、15分間)。このMEF細胞を、0.2%Triton X-100で処理後(室温、10分間)、5%ウシ血清アルブミン(和光純薬)/ブロックエース(雪印乳業)で室温、1時間ブロッキングした。一次
- 15 抗体として、抗LIS1抗体(N-19, SC-7577, ヤギポリクローナル抗体、Santa Cruz Biotechnology;1:100希釈)、抗細胞質ダイニン中鎖抗体(74.1, マウスモノクローナル抗体、Millipore;1:100希釈)、抗βCOP抗体(マウスモノクローナル抗体、Sigma;1:100希釈)、をそれぞれブロッキング溶液で希釈し、室温で1時間反応させた。反応後、この
- 20 MEF細胞をリン酸緩衝液(PBS)で洗浄し、二次抗体としてAlexa546抗マウスIgG(Invitrogen)あるいはAlexa546抗ヤギIgG(Invitrogen)をリン酸緩衝液(PBS)で1:2000希釈したものと室温で1時間反応させた。核染色のために、最終濃度が0.2 μM になるようにDAPI(4', 6-diamino-2-phenylindole, Invitrogen:D13
- 25 06)を添加し、さらに室温で15分間インキュベーションした。インキュベーション後、この細胞をPBSでよく洗浄し、蛍光顕微鏡観察用グリセロール(Merck)を用いて包埋した。

また、微小管のマイナス端が集積している部位の位置情報を得るため、中心体のマーカーである γ チューブリンについても同様に免疫染色を行った。抗ガンマチューブリン抗体としては (Santa Cruz mouse monoclonal antibody マウスモノクローナル抗体、1:100希釈)、二次抗体としては蛍光標識された (Invitrogen Alexa 488 抗マウスIgG, 1:1000希釈) を用いた。

共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5, Leica) にて丁寧に観察を行った後、各々の因子のそれぞれの条件下でのMEF細胞における細胞内局在を「核周辺に集積している細胞」と「細胞質全体に分布している細胞」に2大別して、それぞれの細胞群に対して10標本ずつ、1標本当たり10個の細胞を任意に抽出し、計100個の細胞について評価し、平均値 $\pm$ 標準偏差を算出し、スチューデントt-テスト (unpaired) により有意差検定を行った。結果を図2～図4に示す。図4中の記号は次の意味を表す; N. S. : 有意差なし, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

なお、図2b、図3b、図4bは、細胞を核辺縁部から細胞の辺縁部まで放射状に十分分割し、各々の領域での蛍光強度を測定して (つまり、核辺縁部から細胞の辺縁部まで等間隔で直線状に10点の蛍光強度を測定して) 定量化した結果をグラフ化したものである。蛍光強度は所定の蛋白質の量を反映しており、各々の領域にどれだけの蛋白質が存在しているかを示す。LIS1は中心体周辺に多く存在するべきところ、LIS1ヘテロ変異マウスから確立した線維芽細胞は中心体周辺であってもLIS1量が低下している。しかし、SNJ-1945により、LIS1量は正常に戻る事がわかる (図2)。

また、細胞質ダイニンを中心体周辺をピークになだらかなスロープを形成しているのに対して、LIS1ヘテロ変異マウスから確立した線維芽細胞は中心体周辺をピークに急激に低下しており、細胞周辺では正常に比較して枯渇している。しかし、SNJ-1945により、細胞質ダイニン量も正常に戻る事がわかる (図3)。

また、 β -COPはゴルジ体（線維芽細胞では中心体周辺に局在している）のマーカーの一つであり、細胞質ダイニンの機能をみる指標として一般的に用いられており、正常では中心体に高い密度をもちつつ、細胞周辺に一定の分散を示す。L I S 1のヘテロ変異マウスから確立した線維芽細胞では、細胞質ダイニンと同様に細胞の中心に偏在した分布を示す（図4）。この分布異常は細胞質ダイニンの偏在を反映したものであり、S N J-1945の投与によって細胞質ダイニンの局在が正常化することに伴って分布が正常化しているのがわかる（図4）。

S N J-1945による小脳顆粒神経細胞の遊走能の変化の検討

10 L I S 1遺伝子ヘテロ欠損あるいは野生型マウス（生後3-7日後）の小脳（それぞれ10匹分）を軽くピペッティングにより組織片を破碎した後、0.025%トリプシン（G I B C O : 25200）/0.0013% D N a s e I（S i g m a : D N-25）で37℃、20分間処理した。遠心後、10%ウマ血清を含むBME培養液（G i b c o : 21010）を加えて洗浄し、反応を停止した。その後、0.0052%
15 D N a s e I / 10%ウマ血清を含むBME培養液を加えてピペッティングし、細胞用メッシュ（C e l l s t r a i n e r, 径70 μ m; B e c t o n D i c k i n s o n）を通した後、未処理の24穴プレートに細胞を蒔き、37℃、5%CO₂で30分間プレインキュベーションした。さらに、D N a s e Iを含まない10%ウマ血清を含むBME培養液中で、8-12時間同様にインキュベーションして、小脳顆粒細胞の
20 凝集塊を形成させた。その後、6穴プレート（N u n c）中に、ポリ-L-リジン（S i g m a : P 4707）及びラミニン（S i g m a : L 4544）で処理したカバーガラス（24×24mm; 松浪硝子）を敷き、N u t r i t i o n a l s u p p l e m e n t（N-2 s u p p l e m e n t; G i b c o : 17502048）を含むBME培養液中に小脳顆粒神経細胞の凝集塊を移し、最終濃度が200 μ MになるようにS
25 N J-1945を添加した。この凝集塊を18-24時間、37℃、5%CO₂でインキュベーションした。

対照実験として、1%ジメチルスルホキシド（DMSO, S i g m a : D 8779）を添加し同様の実験を行った。

インキュベーション後、凝集塊をリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後、4%パラホルムアルデヒド (WAKO: 162-16065) で固定した (室温、15分間)。次いで、0.2% Triton X-100で処理後 (室温、10分間)、核染色の為に、最終濃度が0.2 μ MになるようにDAPI (4', 6-diamino-2-phenylindole, Invitrogen: D1306) を添加し、さらに室温で15分間インキュベーションした。その後、PBSで繰り返しよく洗浄し、凝集塊が壊れないように丁寧に蛍光顕微鏡観察用グリセロール (Merck) を用いて包埋した。

共焦点レーザー顕微鏡 (TCS-SP5, Leica) にて丁寧に観察を行った後、それぞれの細胞群について、小脳顆粒細胞凝集塊の辺縁からの神経細胞の移動した距離 (μ m) を測定し、10-210 (μ m) を20 (μ m) ずつに分けて、それぞれの移動距離の範囲内に分布する細胞数を全体の細胞数に対するパーセントで表した。また、平均移動距離 (μ m) を算出し、平均移動距離 (μ m) $\pm$ 標準偏差で表した。有意差検定は、スチューデントt-テスト (unpaired) により行った。結果を図5に示す。

図5に示されるように、Lis1+/-の神経細胞はほとんど遊走しないのに対し、SNJ-1945で処理したLis1+/-の神経細胞では遊走能の回復がみられた。このことから、SNJ-1945により脳滑症を治療し得ることが示された。

SNJ-1945腹腔内投与によるマウス胎児脳でのLIS1蛋白質の変化の検討

ホモ型のEII-Cre形質転換マウス (FVB/N-Tg (EIIa-cre) C5379Lmgd/J, The Jackson Laboratory) の雌5匹に対して、neo遺伝子を持たないneo (-) 129S-Pafahlb1^{tm2Awb}/Jホモマウスの雄1匹を同一のマウスケージで飼育することで交配させ、このマウスケージを計6セット用意して交配実験を開始した。なお、neo (-) 129S-Pafahlb1^{tm2Awb}/Jホモマウスは、上述の方法と同様にして作製した。毎朝7-10時の間にプラーク確認 (交尾の確認) を行い、妊娠周期を決定した。SNJ-1945を100mg/mlの濃度でdimethyl sulfoxide (DMSO, S

igma : D8779)) に溶かし、胎生12日 (E12) の時点で妊娠母体の腹腔内に投与量が100 μ g/体重gになるように注入 (腹腔内投与) した。

SNJ-1945の投与による効果を判定するために、正常マウス胎児、及びLIS1ヘテロ変異マウス胎児 (SNJ-1945投与) のLIS1の蛋白質を測定した。

5 SNJ-1945投与群においては、時間経過に伴うSNJ-1945の効果を判定するために、投与後0時間 (投与直後) 、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、16時間、24時間、48時間、及び72時間の各時間後に脳組織を取り出してLIS1の蛋白質を測定した。なお、LIS1蛋白質の各測定には、マウスを6匹ずつ用いた (n=6) 。

10 母体を頸椎脱臼によって死亡させた後、直ちに胎児を分離し脳組織を単離した。LIS1の蛋白質量の測定はマウス脳を取り出した後、直ちに重量を測定し、マウス脳の重量に対して2倍量の蛋白質溶解液 (30mM Tris-HCl pH. 6.8, 1.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.3% bromophenol blue (BPB, Sigma : B5525-10G)) , 0.3% 2-mercapto-ethanol (2-ME, WAKO : 135-07522) , 15% glycerol) を加え、さらに超音波処理によって完全に可溶化させた。95℃、5分間の熱処理の後、脳組織に由来する蛋白質溶解液1 μ lを12.5%のSDS-アクリルアミド電気泳動によって分離し、抗LIS1抗体 (N-19, SC-7577, ヤギポリクローナル抗体、Santa Cruz Biotechnology ; 1 : 100希釈)) を用いたウェスタンブロッティングによって検出した。

結果を図6に示す。LIS1ヘテロ変異マウス胎児のLIS1タンパク質量は正常マウス胎児の半分程度であるが、SNJ-1945投与により正常程度にまで回復した。また、一回の投与により、その効果は少なくとも3日間持続することが解った。

このことから、SNJ-1945により脳滑症を治療し得ることが示された。

25

SNJ-1945経口投与によるマウス新生児脳でのLIS1蛋白質の変化の検討

ホモ型のEII-Cre形質転換マウス (FVB/N-Tg (EIIa-cre) C5379Lmgd/J、The Jackson Laboratory) の雌5匹に

対して、neo遺伝子を持たないneo (−) 129S-Pafahlb1^{tm2Awb} / Jホモマウスの雄1匹を同一のマウスケージで飼育することで交配させ、このマウスケージを計6セット用意して交配実験を開始した。毎朝出産を確認し、出産確認時を新生児と定義した。SNJ-1945を100mg/mlの濃度でdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし、投与量が200μg/体重gになるようにピペットを用いて経口で投与した。

SNJ-1945の投与による効果の判定のために、正常マウス新生児、及びLIS1ヘテロ変異マウス新生児 (SNJ-1945投与) のLIS1の蛋白質を測定した。SNJ-1945投与群においては、時間経過に伴うSNJ-1945の効果判定するために、投与後0時間 (投与直後)、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間の各時間後に脳組織を取り出してLIS1の蛋白質を測定した。なお、LIS1蛋白質の各測定には、それぞれマウスを6匹ずつ用いた (n=6)。

新生児マウスを断頭して死亡させた後、直ちに脳組織を単離した。LIS1の蛋白質量の測定は、マウス脳を取り出した後、直ちに重量を測定しマウス脳の重量に対して2倍量の蛋白質溶解液 (30mM Tris-HCl pH. 6.8, 1.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.3% bromophenol blue (BPB), 0.3% 2-mercapto-ethanol (2-ME), 15% glycerol) を加え、さらに超音波処理によって完全に可溶化させた。95℃、5分間の熱処理の後、脳組織に由来する蛋白質溶解液1μlを12.5%のSDS-アクリルアミド電気泳動によって分離し、抗LIS1抗体 (N-19, SC-7577, ヤギポリクローナル抗体、Santa Cruz Biotechnology; 1:100希釈) を用いたウエスタンブロッティングによって検出した。

結果を図7に示す。LIS1ヘテロ変異マウス新生児のLIS1タンパク質量は正常マウス新生児の半分程度であるが、SNJ-1945投与により正常程度にまで回復した。また、一回の投与により、その効果は少なくとも3日間持続することが解った。

このことから、出生後であっても、SNJ-1945の経口投与により脳滑症を治療し得ることが示された。

SNJ-1945腹腔内投与によるマウス成体脳でのLIS1蛋白質の変化の検討

LIS1ヘテロ変異マウスに対してSNJ-1945を100mg/mlの濃度でdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし、生後3週間の時点で投与量が100 μ g/体重gになるように腹腔内に注入した。

SNJ-1945の投与による効果の判定のために、正常マウス成体、及びLIS1ヘテロ変異マウス成体 (SNJ1945投与) のLIS1の蛋白質を測定した。SNJ-1945投与群においては、時間経過に伴うSNJ-1945の効果を検討するために、投与後0時間 (投与直後)、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、16時間、24時間、48時間、72時間の各時間後に脳組織を取り出してLIS1の蛋白質を測定した。なお、LIS1蛋白質の各測定には、それぞれマウスを6匹ずつ用いた (n=6)。

生体マウスを頸椎脱臼によって死亡させた後、脳組織を直ちに単離した。LIS1の蛋白質量の測定は、マウス脳を取り出した後、直ちに重量を測定しマウス脳の重量に対して2倍量の蛋白質溶解液 (30mM Tris-HCl pH. 6.8, 1.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.3% bromophenol blue (BPB), 0.3% 2-mercapto-ethanol (2-ME), 15% glycerol) を加え、さらに超音波処理によって完全に可溶化させた。95℃、5分間の熱処理の後、脳組織に由来する蛋白質溶解液1 μ lを12.5%のSDS-アクリルアミド電気泳動によって分離し、抗LIS1抗体 (N-19, SC-7577, ヤギポリクローナル抗体、Santa Cruz Biotechnology; 1:100希釈) を用いたウェスタンブロッティングによって検出した。

結果を図8に示す。LIS1ヘテロ変異マウス成体のLIS1タンパク質量は正常マウス成体の半分程度であるが、SNJ-1945投与により正常程度にまで回復した。また、一回の投与により、その効果は少なくとも3日間持続することが解った。

このことから、出生後であっても、SNJ-1945の投与により脳滑症を治療し得ることが示された。

SNJ-1945腹腔内投与によるマウス胎児脳のアポトーシスに与える影響の検討

ホモ型のEII-Cre形質転換マウス (FVB/N-Tg (EIIa-cre) C5379Lmgd/J、The Jackson Laboratory) の雌5匹に
5 対して、neo遺伝子を持たないneo (-) 129S-Pafahlb1^{tm2Awb}/Jホモマウスの雄1匹を同一のマウスケージで飼育することで交配させ、このマウスケージを計6セット用意して交配実験を開始した。毎朝7-10時の間にプラーク確認
(交尾の確認) を行い、妊娠周期を決定した。SNJ-1945を100mg/mlの濃度でdimethyl sulfoxide (DMSO) に溶かし、隔日でE9. 5
10 日 (妊娠9. 5日) より100μg/体重gを、LIS1変異マウス (Lis1+/-) およびコントロールマウス (正常胎児マウス) の妊娠マウス母体の腹腔内に投与した。E15. 5 (妊娠15. 5日) において、マウス母体を頸椎脱臼によって死亡させた後、マウス胎児を取り出し4%パラホルムアルデヒド (WAKO: 162-16065) で24時間固定し、PBSに置換後、乗法に従ってパラフィン包埋を行った。組織
15 ブロックを5μm厚の切片にし、APSコートのスライドガラスの上に接着させた。

脱パラフィン操作の後、20μg/mlのproteinase K/PBS処理を室温で15分行い3%のH₂O₂/PBS処理を室温で10分行った。ApopTag Apoptosis Detection Kit (Millipore: S7100) を用いてTUNNEL (TdT-mediated dUTP nick end
20 labeling) stainを行いアポトーシスを検出した。なお、TUNNEL stainは断片化DNAを検出することによりアポトーシスを検出することができる方法として知られている。

結果を図9に示す。正常マウスではほとんどアポトーシスは見られないが、LIS1変異マウスでは高頻度に見られた。さらに、SNJ-1945の投与により、LIS1変異マウスに見られるアポトーシスは有意に軽減することがわかった。
25 このことから、SNJ-1945の投与により滑脳症の症状が軽減され得ると考えられた。

滑脳症モデルマウス (L I S 1 遺伝子ヘテロ欠損マウス) の行動解析

滑脳症患者は、運動機能が著しく低下している。そこで、滑脳症の治療効果を確認するため、滑脳症モデルマウスの運動機能を指標とした検討を行った。

5 <行動解析実験用マウスの準備>

行動解析実験に当たり、野生型マウスとL i s 1 (+/-) のヘテロ変異体マウスを5つの群 (C群、M1群、M2群、M3群、及びM4群) へと群分けした。各群に属するマウスの詳細は、次の通りである。なお、餌としては (CE-2、日本クレア) を用いた。使用した野生型マウス及びヘテロマウスの作製方法は、上述の「L I S 1 遺伝子ヘテロ欠損型マウス (L I S 1 ヘテロ変異マウス) の作製」と同様である。

C群：コントロール群の野生型マウス

M1群：SNJ-1945の非投与のL i s 1 ヘテロマウス

15 M2群：SNJ-1945を100mg/mlの濃度でdimethyl sulfoxide (Sigma D-5879) に溶かし、胎生9.5日 (E9.5) の時点で、投与量が200µg/母体体重g/日になるよう、妊娠母体の餌にSNJ-1945を加えて投与し、さらに出生後は下記M3群と同様の投与を行った、L i s 1 ヘテロマウス

20 M3群：生後当日より0.5%CMC (carboxymethyl cellulose sodium salt：和光039-01335) にSNJ-1945を50mg/mlの濃度で溶解したものを200µg/体重g/日になるように強制経口投与を行い、さらに生後21日目からは投与量が200µg/体重g/日になるように餌にSNJ-1945を加えたものを投与した、L i s 1 ヘテロマウス

25 M4群：生後10日目より0.5%CMC (carboxymethyl cellulose sodium salt) にSNJ-1945を50mg/mlの濃度で溶解したものを200µg/体重g/日になるように強制経口投与を行い、さらに生後21日目からは投与量が200µg/体重g/日になるように餌にSNJ-1945を加えたものを投与した、L i s 1 ヘテロマウス

- 食餌 (CE-2、日本クレア) にSNJ-1945を混ぜ、SNJ-1945投与量が
 $200 \mu\text{g}/\text{体重g}/\text{日}$ になるように継続的に各マウスに経口投与した。行動解析実験
 は、各群12~16匹のマウスを用意し、行動実験施設で1~2週間予備飼育した後、
 5 約9週齢から12週齢の期間に行った。行動解析実験終了後は、遺伝子型の判定を行い、
 全てのマウスについて遺伝子型を確認した。

なお、行動解析の結果が各群の違いに起因することを保証するため、行動解析開始前
 に、以下の(i)~(iv)の点において、異常を示すマウスがないことを確認した。

(i) 健康状態

- 10 直腸温測定、体重測定を行い、直腸温や体重において各群に異常、有意差がないことを
 確認した。また、ひげの状態 (ひげが短くなっていないか、なくなっていないか)、体
 毛の状態 (体毛がはげていないか、毛並みがきちんと整えられているか) の確認を行っ
 た。問題のある個体はいなかった。

(ii) 神経学的な異常神経学的な異常がないか、以下の項目について確認した。

- 15 Righting Reflex (ひっくり返して元に戻るか)
 Whisker-Twitch (ひげを触ったときに、振り返る等の反応があるか)
 Ear-Twitch (耳を触ったときに、振り返る等の反応があるか)
 Reaching (宙づりしたときに前の机に手を伸ばすか、視覚の確認)
 Key Jangling (鍵束を振る音への反応があるか、聴覚、痙攣感受性の確
 20 認)。

これらの項目について、反応に異常があるマウスはいなかった。

(iii) 握力と筋力

握力測定と筋力測定を行い、握力、筋力に問題がないか、以下の項目について確認した。

- Wire hang test (マウスを金網にしがみつかせてから、金網をひっくり
 25 返すテスト)
 Grip Strength test (マウスを金網にしがみつかせて引っ張り、マ
 ウスの筋力を測定するテスト)

これらの試験の結果、各群には有意な差はなく、握力や筋力に問題がないことがわかった。

(i v) 不安様行動

- 不安様行動のテストとして、明暗選択テストを行った。明るい箱と暗い箱が、一か所で
- 5 接続されている装置を用意し、マウスを暗箱の中に置く。マウスは一般的に暗い場所を好むが、探索行動を行うために明るい箱にも侵入する。10分間に明箱と暗箱にそれぞれ滞在していた時間、明箱と暗箱を行き来した回数、最初に明箱に入るまでの潜時、移動距離を測定した。明箱の滞在時間が短い、行き来した回数が少ない、最初に明箱に入るまでの潜時が長いなどのときは、不安様行動が亢進していると考えられる。実験の結果、各群に有意差がなく、また、明箱、暗箱それぞれの滞在時間に差がなかった。不安
- 10 様行動は亢進していないと考えられ、実験環境、実験者等に馴化していることが確認できた。

<統計処理>

- 15 マウスの行動解析実験データの統計処理は、統計ソフトStat View (SAS institute) を用いて行った。前記5群全体についてANOVA解析 (多群の分散分析) を行い、危険率 (p 値) が5%以下 ($p < 0.05$) のものについて有意差ありと判定した。ANOVA解析で比較対象決定後の多重比較 (事後比較) には、Fisher's PLSD法を用いた。

20

<行動解析実験1：ローターロッドテスト>

- 協調運動・運動学習のテストとして、ローターロッドテストを行った。当該テストの概要は次の通りである。円柱状の棒 (ロッド) が一定の速度で回転する装置を用意し、マウスを回転するロッドにのせると、マウスは落ちないようにロッドの上を歩く。ロッド
- 25 の回転スピードを5分間の間で、5rpmから40rpmまで加速していった。1試行は、マウスがロッドから落ちるか、5分が経過するまで行った。実験は1日3試行で2日間 (合計6試行) 行った。試行を繰り返すにつれ、マウスはロッドからなかなか落ちなくなるため、ロッドの上での滞在時間が長くなる。運動学習能力が減少している (劣

る) マウスは、ロッドから落ちないような運動の上達が悪くなり、ロッドの上での滞在時間が長くない。実験の結果、C群が、もっとも運動の上達が早く、滞在時間が長かった(図10、11)。M1群はC群と比べて、運動の上達が遅く、滞在時間が有意に減少しており、よって運動学習能力が減少していることがわかった(図10、11)。

- 5 SNJ-1945投与を行ったM2、M3群は、運動の上達曲線がM1群とC群の中間にあり(図10)、総合滞在時間は、C群と有意差がないレベルまで長くなっており、SNJ-1945の経口投与による運動学習能力の改善が確認できた(図11)。

<行動解析実験2: Gait Analysis>

- 10 運動機能の異常や小脳失調などを調べるため、歩行(足跡)を解析するテスト(Gait Analysis)を行った。具体的には、24cm/秒で回転する透明なトレッドミル上にマウスを乗せて、歩行させ、下から高速カメラ(150 frame/秒)で撮影して足跡を専用ソフト(DigiGait, MOUSE SPECIFICS, Inc.)で解析した。このテストで、歩幅や足の角度の他、足の付き方や離れ方など
- 15 多種の指標を評価した。

[Gait Analysisの主な解析項目]

- ・Swing Duration: 足が空中に浮いている時間
- ・%Swing: 一歩踏み出す動作において、足が空中に浮いている時間の割合
- 20 ・Braking Duration: ベルトに足がついてから、完全に足がベルトに密着するまでの時間
- ・%Braking: 一歩踏み出す動作において、ベルトに足がついてから、完全に足がベルトに密着するまでの時間の割合
- ・%Brake of Stance: 足がベルトに接している動作において、ベルト
- 25 に足がついてから、完全に足がベルトに密着するまでの時間の割合
- ・Propulsion Duration: 完全に足がベルトに密着してから、足がベルトから離れる直前までの時間

・%Propulsion: 一歩踏み出す動作において、完全に足がベルトに密着してから、足がベルトから離れる直前までの時間の割合

・%Propel of Stance: 足がベルトに接している動作において、完全に足がベルトに密着してから、足がベルトから離れる直前までの時間の割合

5 ・Stance Duration: 足がベルトに接している時間

・%Stance: 一歩踏み出す動作において、足がベルトに接している時間の割合

・Stride Duration: 一歩踏み出すのにかかる時間

・Swing-to-stance ratio: 足が空中に浮いている時間と足がベルトに接している時間の比

10

有意差があったのは、%Swing (一歩踏み出す動作において、足が空中に浮いている時間の割合) とSwing-to-stance ratio (足が空中に浮いている時間と足がベルトに接している時間の比) であった。そこで、これらを指標とした検討を行うこととした。なお、%Swingは、関節炎などがある動物の場合、値が上昇することが知られている。これは、空中で足を踏み出す場合に、関節がスムーズに動かないためと考えられている。

15

C群に比べて、M1群は有意に%Swingが上昇しており、足を踏み出す運動機能に異常があると考えられた(図12)。SNJ-1945投与を行ったM2, M3, M4群は、C群と有意差がなく、運動機能の改善が確認できた。Swing-to-stance-ratioは、歩き方が変わる時に変化する値で、走っている状態に近づく

20

ほど1に近くなる。C群に比べて、M1群は有意にSwing-to-stance-ratioが減少し、1に近づいているが、SNJ-1945を投与したM2群は、C群と有意差がないレベルに戻り、M3及びM4群でもM1群に比べ1に近づいていた

25

ヒト滑脳症患者由来細胞の解析

<ヒト滑脳症患者の遺伝子診断>

滑脳症患者および両親より血液1mlを採取し、1.5ml用のサンプルカップ (Bio-BIK: SC-015) 用いて4℃、3000回転/分で遠心分離を行った。白血球を含む沈殿表層を50 μ l採取し、DNA抽出buffer 250 μ l (10mM Tris-HCl pH7.5、0.5% sodium dodecyl sulfate, 10mM ethylenediaminetetraacetic acid, Proteinase K 10 μ g/ml (Roche 03-115-852-001)) に溶解し、37℃で1時間反応させた。その後、Phenol 100 μ l、Chloroform 100 μ lを加え、激しく混和したのち4℃、15,000回転/分で5分間遠心分離を行った。上清250 μ lを新たな1.5 ml用の
5 サンプルカップ (Bio-BIK: SC-015) に移し、3M酢酸ナトリウム30 μ l、エタノール700 μ lを加え、混和したのち4℃、15,000回転/分で5分間遠心分離を行った。上清を捨て、沈殿したDNAを溶解バッファー100 μ l (10mM Tris-HCl pH7.5、1mM ethylenediaminetetraacetic acid) に溶かし、遺伝子診断に用いた。

15 遺伝子診断は、tctaaaatag ttatcctttg ttacとaggtgaataaaggaacactgtacaをプライマーとしてPCRで遺伝子を増幅して行った。患者のDNA 1 μ l、10mM dNTP 1 μ l、100 μ M プライマー1 μ l、BIOTAG (Bioline Bio21040) 0.5 μ lを計50 μ lの反応液に加え、94℃:20秒、55℃:30秒、72℃:60秒を35サイクル回すPCR (Applied Biosystems Gene Amp 9700) で増幅し、DNAの塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定はtctaaaatag ttatcctttg ttacとaggtgaataaaggaacactgtacaをプライマーとしてBig Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems #4336917) を用いて行った。サイクルシ
20 ーケンスは、94℃:20秒、55℃:30秒、60℃:4分を35サイクル (Applied Biosystems Gene Amp 9700) で行い、反応物をABI 3500xL (Applied Biosystems) で判読した。その結果、タンパク質翻訳領域の460番目のcytosineがthymineに置き換わって

おり、これによりストップコドンが生じ、タンパク質の翻訳がそこで終了することによって機能的に不活性なLIS1ができることが分かった（図14）。

<ヒト滑脳症患者由来線維芽細胞の確立>

- 5 線維芽細胞の確立は次のようにして行った。即ち、無菌的に上記滑脳症患者から表皮の一部（5mm四角）を提供してもらい、培養液（E-MEM（和光051-07615）、10% ウシ胎児血清（Equitech-Bio Inc、SFBM30-1798、1xL-Glutamine（Gibco 25030）、1xPen Strep（Gibco 15140）；以下、培養液として当該組成のものを使用した）
- 10 中に保存して室温で4時間輸送した。輸送後、組織片を1mm四角に裁断し、培養フラスコ（Becton Dickinson 353009）に固着させ、培養液6ml中で3週間培養した。3週間培養の後、組織片からの線維芽細胞が増殖を確認の後、（Phosphate buffered saline、PBS（-）、137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH7.4）で洗浄しTrypsin-EDTA（Gibco 25200）を0.5
- 15 ml加えて37℃で5分間反応させ細胞を分離したのち、培養液を10ml加え、10cmシャーレ（Greiner 664-160）に移して培養した。

<細胞蛍光免疫染色>

- 20 細胞を顕微鏡で観察するために、カバーガラス上で細胞を培養した。カバーガラス（24x24 No. 1、マツナミ）を、0.1M塩酸に20分浸けて、水洗後、70%エタノールに置いてクリーンベンチ内で保存した。クリーンベンチ内で6wellプレート（FALCON 353046）の各well底に当該カバーガラスを一枚ずつ置き、エタノールを乾燥させた後、1wellあたり 0.5×10^5 個の線維芽細胞
- 25 を添加し、16時間培養して、カバーガラス上に細胞を接着させた。

SNJ-1945含有培養液を用意した。具体的には、DIMETHYL SULFOXIDE（SIGMA D-5879）に溶解したSNJ-1945を培養液に最終濃度200μMとなるように混合し、1時間37℃に静置し、SNJ-1945を培地

に溶解させて、SNJ-1945含有培養液とした。上述の6wellプレートで培養した細胞に対し、well中の培地を捨てた後SNJ-1945含有培養液を2ml/wellで加えて、2時間培養を行った。またコントロールとして、同量のDIMETHYL SULFOXIDEを添加した培養液を用いて、同様に培養を行った。

- 5 2時間培養後、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline、PBS (-)、137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.8mM KH₂PO₄, pH7.4) で洗浄し、4% Paraformaldehyde (PFA) in PBS (-) (和光 163-20145) を加え、室温で15分おいて、細胞を固定した。PBS (-) で洗浄し、0.
- 10 2% triton X-100 (Polyoxyethylen (10) Octyl phenyl Ether, 和光 168-11805) in PBS (-) を加え、室温で10分おいて、細胞の浸透化を行った。さらに細胞をPBS (-) で洗浄し、Blocking solution (3% BSA (Sigma A3156-5G)、4% ブロックエース粉末 (雪印乳業株式会社)、PBS (-)) を添加し、室温で
- 15 時間おいて、非特異的結合をブロックできるようにした (ブロッキング処理)。一次抗体は、15000rpm、4℃、5分遠心したものの上清をBlocking solutionで100倍希釈して使用した。

- Wet chamberにパラフィルムをひいて、抗体溶液を300μlのせ、カバーガラスの細胞面が下になるように当該抗体溶液上において、室温で1時間静置して反
- 20 応させた。PBS (-) を入れた6wellプレートに細胞の接着したカバーガラスを戻し、5分間振とうする洗浄を4回繰り返した。二次抗体と、核を染色するための色素10mM DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, 同仁 28718-90-3) は、15000rpm、4℃、5分遠心したものの上清をPBS (-) で1000倍 (DAPIは500倍) 希釈し、1wellあたり1.5
- 25 ml加えて、遮光し、室温で1時間ゆっくり振とうさせながら反応させた。PBS (-) を加えて、5分振とうする洗浄を4回繰り返した。スライドガラス (蛍光染色用 S0318、マツナミ) に封入液 (Fluor Save Reagent、CALBIOCHEM) を一滴ずつ滴下し、細胞面が下になるようにカバーガラスをかぶせて封

入した。空気の侵入を防ぐために、カバーガラスの周囲をラッカーで密封した。30分～1時間程度固定して、カバーガラス表面を、水を含ませた麵棒で洗浄した後、エタノールを含ませた麵棒でクリーニングを行い、観察試料とした。

なお、蛍光染色用に用いた抗体の一覧を以下の表2に示す。

5 [表2]

LIS1	一次抗体	抗 LIS1 ウサギ抗血清 抗 γ -チューブリンマウス IgG (sc-17787, SANTA CRUZ)
	二次抗体	抗ウサギ IgG ヤギ IgG-AlexaFluor546 (A11010, invitrogen) 抗マウス IgG ロバ IgG-AlexaFluor488 (A11055, invitrogen)
ダイニン中間鎖 (DIC)	一次抗体	抗ダイニン 74k 中間鎖マウス IgG (MAB1618, CHEMICON) 抗 γ -チューブリンヤギ IgG (sc-7396, SANTA CRUZ)
	二次抗体	抗マウス IgG ヤギ IgG-AlexaFluor546 (A11003, invitrogen) 抗ヤギ IgG ロバ IgG-AlexaFluor488 (A11055, invitrogen)
β -COP	一次抗体	抗 β -COP マウス IgG (G6160, SIGMA-ALDRICH) 抗 γ -チューブリンヤギ IgG (sc-7396, SANTA CRUZ)
	二次抗体	抗マウス IgG ヤギ IgG-AlexaFluor546 (A11003, invitrogen) 抗ヤギ IgG ロバ IgG-AlexaFluor488 (A11055, invitrogen)

<共焦点顕微鏡観察>

蛍光免疫染色を行った細胞の観察を共焦点顕微鏡 (TCS FP5S, Leica)で行った。3種類のレーザー (Diode 405 nm, Argon 488 nm 出力30%, HeNe 543 nm) を用いて、蛍光色素を励起し、油振対物レンズ

10 (HCX PL Apo lambda blue 63x1.4 Oil) を使用して観察した。画像の撮影には専用ソフトウェア (LAS AF, Leica) を使い、Zoomx2, 512x512 pixel, scan speed 400Hz, frame average 4の条件で撮影した。細胞の境界は、微分干渉像を同時に撮影して得た。撮影画像は、LIF (Leica Image Format) ファイルから、TIFF形式のファイルに変換して画像解析を行った。蛍光顕微鏡画像の解析

15 は、ImageJ (NIH) を用いて行った。

[LIS1の分布：図15及び図16]

抗Lis1抗体を用いて蛍光免疫染色した培養細胞を用いて、LIS1の細胞内の分布を観察した。その結果、正常なLis1 (+/+) 細胞では、LIS1は、核および

20 中心体周辺に局在しており、細胞辺縁部には、ほとんど見られなかった。Lis1 (+

- ／－)細胞では、L i s 1 (＋／＋)細胞で見られた核周辺へのL I S 1の集積が失われ、核周辺から細胞辺縁部まで、一様に分布していた。特にL i s 1 (＋／＋)細胞ではほとんど見られなかった、細胞の縁に沿った分布が顕著に観察された。このL i s 1 (＋／－)細胞をS N J－1 9 4 5で処理すると、再びL i s 1 (＋／＋)と同様に、
- 5 核および中心体周辺へL I S 1が集積することが確認できた。このことから、S N J－1 9 4 5処理によって、ヒト滑脳症患者由来細胞のL I S 1の細胞内分布を、正常な細胞と同様の分布へと回復させることができることがわかった。

〔細胞質ダイニンの分布：図1 7及び図1 8〕

- 10 抗D I C (細胞質ダイニン中間鎖)抗体を用いて蛍光免疫染色した培養細胞を用いて、細胞質ダイニンの細胞内の分布を観察した。その結果、L i s 1 (＋／＋)細胞では、細胞質ダイニンは、核および中心体周辺から、細胞辺縁部にかけて、ゆるやかな勾配を持ちながら、全体に分布していた。一方、L i s 1 (＋／－)細胞では、周辺部への細胞質ダイニンの拡散が失われて、核および中心体周辺に細胞質ダイニンの強い局在が見
- 15 られた。このL i s 1 (＋／－)細胞をS N J－1 9 4 5で処理すると、再びL i s 1 (＋／＋)細胞と同様に、核周辺から細胞辺縁部にかけて、細胞質ダイニンが全体に分布するようになった。このことから、S N J－1 9 4 5処理によって、ヒト滑脳症患者由来細胞の細胞質ダイニンの細胞内分布を、正常な細胞と同様の分布へと回復させることができることがわかった。

20

〔 β -COP小胞の分布：図1 9及び図2 0〕

- β -COP小胞の細胞内の分布を、抗 β -COP抗体を用いて観察した。その結果、L i s 1 (＋／＋)細胞では、 β -COP小胞は、核および中心体周辺から、細胞辺縁部にかけて、ゆるやかな勾配を持ちながら、全体にほぼ均一に分布していた。L i s 1 (＋／－)細胞では、核周辺以外への β -COP小胞の拡散が失われて、核および中心体周辺に大きく β -COP小胞が局在していた。このL i s 1 (＋／－)細胞をS N J－1 9 4 5で処理すると、再びL i s 1 (＋／＋)細胞と同様に、核周辺から細胞辺縁部にかけて、 β -COP小胞がほぼ一様に分布するようになった。このことから、S N
- 25

J-1945処理によって、ヒト滑脳症患者由来細胞の β -COP小胞の細胞内分布を、正常な細胞と同様の分布へと回復させることができることがわかった。

なお、図16、18、20は、図2b、図3b、図4bと同様の解析結果を示すグラフである。すなわち、具体的には、次のようにして作成したグラフである。LIS1、
5 細胞質ダイニン、 β -COP小胞それぞれの細胞内局在を、核辺縁部から細胞の辺縁部まで等間隔で直線状に10点の蛍光強度を測定した。各条件においてそれぞれ20個の細胞を計測し、各点の蛍光強度は細胞全体の蛍光強度を1として規格化した値をグラフ化した。誤差線は標準誤差を示す。

LIS1の分布は、正常な細胞で核周辺部に集積し、Lis1 (+/-) 細胞では、
10 細胞全体に拡散してしまうが、SNJ-1945処理によって、正常な細胞と同レベルまで核周辺部への集積が回復した(図16)。細胞質ダイニンと β -COP小胞は、正常な細胞では細胞全体に分布しているが、Lis1 (+/-) 細胞では、細胞核周辺部への集積が起こる。SNJ-1945処理によって、正常な細胞と同様の細胞内分布に回復させることができた(図18、20)。

15

<タンパク質定量>

[細胞抽出液の調製]

クリーンベンチ内で6wellプレートに1wellあたり 3×10^5 個の細胞を添加し、16時間培養し、プレートの各wellに細胞を接着させた。Well中の培地
20 を捨て、上記SNJ-1945含有培養液(DIMETHYL SULFOXIDEにSNJ-1945を溶解させたものを、SNJ-1945終濃度が $200 \mu\text{M}$ となるよう加えた培養液)を 2ml/well の割合で加え、2時間培養を行った。またコントロールとして、同量のDIMETHYL SULFOXIDE(SIGMA D-5879)を添加した培地を用いて同様に培養を行った。

25

SNJ-1945を添加して2時間培養した後、細胞をPBS(-)で2回洗浄し、PBS(-) $500 \mu\text{l}$ を加えて、セルスクレイパーで細胞を掻き取った。1.5mlチューブに回収し、 15000rpm 、5分、 4°C で、遠心し、上清を捨て、細胞の沈

5 澱を得た。PBS (－) 500 μ l を、細胞を掻きとったあとのwellに入れて、再度セルスクレイパーで残った細胞を掻き取り、沈殿に加えた。15000 rpm、5分、4℃で、遠心し、上清を捨て、細胞の沈澱を得た。さらに、PBS (－) 500 μ l を、細胞を掻きとったあとのwellに入れて、残った細胞を回収し、沈殿に加え、15000 rpm、5分、4℃で、遠心し、上清を捨て、細胞の沈澱を回収した。

細胞を回収したチューブに70 μ l ずつLysate bufferを加え、ピペッティングして細胞を溶解し、細胞懸濁液を得た。なお、Lysate bufferは用時調整とし、組成は次の通りである。

10 20mM tris-HCl (2-Amino-2-hydroxymethyl-1, 3-propanediol, pH7. 5, 100mM NaCl, 5mM EDTA, 0. 1% triton X-100, 10 μ g/ml pepstatin A, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml Leupeptin, 1mM PMSF (Benzylsulfonyl Fluoride, SIGMA P7626-5G)

15 次に、当該細胞懸濁液を液体窒素で凍結させた。そして、凍結させた細胞懸濁液をもう一度溶かした。この細胞懸濁液をさらにピペッティングし、超音波処理を行い、細胞を溶解させた。この液体窒素凍結、ピペッティング、超音波の一連の処理を3回繰り返した。その後、15000 rpm、5分、4℃で、遠心し、上清を回収し、新しいチューブに入れた。これを細胞抽出液として実験に用いた。

20

[Western blotting]

細胞抽出液の吸光度を測定し、溶液全体のタンパク定量を行った。Lysate bufferに溶かしたウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA, Sigma A3156-5G) を標準試料として用いた。96well plateに、ブラッドフォード試薬を200 μ l 入れ、細胞抽出液2 μ l を加えて、595nmの吸光度を96well plate reader ARVO Sx (PerkinElmer) で測定し、全体のタンパク量を定量した。

次に、SDS-PAGEを行った。10% ポリアクリルアミドミニスラブゲルを用意し、細胞抽出液をサンプルバッファ (250mM Tris-HCl pH6.8, 40% glycerol, 8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5% 2-mercaptoethanol, 5% Bromophenol blue) と3:1で混合した。ブラッドフォード法で定量したタンパク量をもとに、10 μ g/wellをとなるように、ゲルの各wellにLoadした。同時に電気泳動用タンパク質マーカー (Precision Plus Protein Standards dual Color 161-0373, BIO-RAD) を5 μ l Loadした。泳動buffer (25mM tris, 192mM glycine, 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)) を用いて、ミニスラブゲル1枚当たり20mA, 85分の条件で電気泳動を行った。

電気泳動終了後のゲルからPVDFメンブレン (Immobilon-P IPVH 00010, MILLIPORE) にタンパク質を転写した。150mA, 90分の条件で転写を行った。なお、転写のために用いたTransfer bufferの組成は次の通りである。

A液: 0.3M tris-HCl pH9.6, 0.02% SDS,

B液: 25mM tris-HCl pH10.2, 0.02% SDS,

C液: 25mM tris-HCl pH10.2, 0.02% SDS, 2mM 6-アミノヘキサン酸

タンパク質転写後のメンブレン1枚当たり30mlのBlocking buffer (5% BSA, 4% ブロックエース、25mM tris-HCl pH7.6, 137.7mM NaCl, 0.1% tween-20) にメンブレンを入れて、室温で1時間振とうして、非特異的結合をブロックした (ブロッキング処理)。一次抗体は、15000rpm、4℃、5分遠心したものの上清をBlocking solutionで100~300倍希釈して使用した。一次抗体は、Wet Chamber内で室温下、1時間メンブレンと反応させた。一次抗体反応後、TTBS buffer (25mM tris pH7.6, 137.7mM NaCl, 0.1% tween-20) で10分間振とうし、3回メンブレンの洗浄を行った。二次抗体は、15

000rpm、4℃、5分遠心したものの上清をTTBSに1000倍希釈して使用した。二次抗体は、Wet Chamber内で室温下、1時間メンブレンと反応させた。TTBS bufferで10分間振とうし、3回洗浄した。MilliQ水で3分間振とうし、3回洗浄した。AP buffer (100mM tris pH9.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) にNBT/BCIP液 (NBT/BCIP Stock Solution, Roche) を1%加えたものを発色液として、メンブレンを発色液に浸し、10分から30分発色させた。MilliQ水で3分間振とうし、3回洗浄した。キムタオルで両面をはさんでメンブレンを乾燥させた。

10 なお、当該Western blottingに用いた一次抗体及び二次抗体の一覧を、以下の表3に示す。

[表3]

LIS1

一次抗体 抗LIS1 ウサギ抗血清

二次抗体 抗ウサギIgG ロバIgG-Alkaline Phosphatase (711-055-152, Jackson ImmunoResearch)

ダイニン中間鎖(DIC)

一次抗体 抗ダイニン 74k 中間鎖マウスIgG (MAB1618, CHEMICON)

二次抗体 抗マウスIgG ヤギIgG-Alkaline Phosphatase (115-055-044, Jackson ImmunoResearch)

β-actin

一次抗体 抗β-actin マウスIgG (A2228, SIGMA-ALDRICH)

二次抗体 抗マウスIgG ヤギIgG-Alkaline Phosphatase (115-055-044, Jackson ImmunoResearch)

ルミノイメージアナライザーLAS-3000 (富士フイルム) を用いて、乾燥させたメンブレンを解析し、画像の取り込みを行った。専用ソフトLAS3000IR (富士フイルム) を用いて、Exposure type - Precision, Exposure time - Auto, Sensitivity - Standard, Brightness - 5の条件で、Method - Digitize EPIモードで撮影した。撮影した画像TIFF形式で保存し、専用の画像解析ソフトウェアMultiGauge V3.1 (富士フイルム) を用いて、目的のタンパク質のバンドの吸光度を測定した。ヒト線維芽細胞内のLIS1, 細胞質ダイニン、β-actinそれぞれのタンパク質の総量をWestern blottingのバンドによって確認した (図21)。また、実験を4回行った結果の平均をグラフ化した (図2

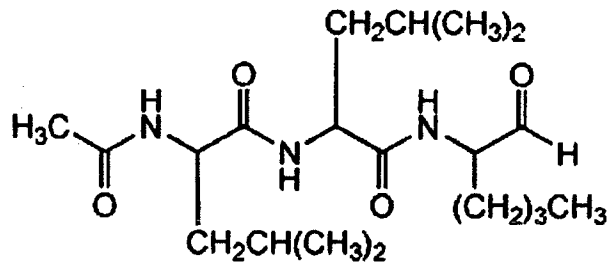
2 : 誤差線は標準誤差を示し、有意差は危険率5%でt検定を行って判定した)。その結果、L i s 1 (+/-) の細胞のL I S 1の量は、正常な細胞のL i s 1 (+/+) と比べて半分以下に減少していたが、薬剤処理を行った後のL I S 1の量は、L i s 1 (+/+) のL I S 1のレベル近くまで回復していた。細胞質ダイニン中間鎖の量も増加がみられた。コントロールタンパク質として観察した β -a c t i nの量の変化は見られなかった。このことから、S N J - 1 9 4 5によって、タンパク質分解酵素であるカルパインの機能を阻害することで、L I S 1の分解が抑えられて、細胞内のL I S 1の量が正常細胞に近いレベルにまで増加したことが確認できた。

10 S N J - 1 9 4 5以外のカルパイン阻害剤を用いた検討 (参考検討例)

正常マウス及びL i s 1 (+/-) のヘテロ変異体マウス (各群8匹) を、通常食餌 (C E - 2、日本クレア) で飼育し、生後3週齢で、カルパイン阻害剤であるA L L N (M e r c k 2 0 8 7 1 9) を10 m g / m lとなるようd i m e t h y l s u l f o x i d eに溶かし、A L L N 4 0 μ g / g体重相当量をマウス腹腔内に注入した。また他のカルパイン阻害剤であるE 6 4 d (R o c h e 1 5 8 5 6 8 1) を10 m g / m lとなるようd i m e t h y l s u l f o x i d eに溶かし、E 6 4 d 2 0 μ g / g体重相当量をマウス (8匹) の腹腔内に注入した。注入後、6時間及び24時間後に投与マウスを麻酔処置後頸椎脱臼によって死亡させ、直ちに脳組織を単離した。L I S 1の蛋白質量の測定はマウス脳を取り出した後、直ちに重量を測定し、マウス脳の重量に対して2倍量の蛋白質溶解液 (30mM T r i s - H C l p H . 6 . 8 , 1 . 5 % s o d i u m d o d e c y l s u l f a t e (S D S) , 0 . 3 % b r o m o p h e n o l b l u e , 0 . 3 % 2 - m e r c a p t o - e t h a n o l , 1 5 % g l y c e r o l) を加え、さらに超音波処理によって完全に可溶化させた。95℃、5分間の熱処理の後、脳組織に由来する蛋白質溶解液1 μ lを12.5%のS D S - アクリルアミド電気泳動によって分離し、抗L I S 1抗体を用いたウェスタンブロットティングによってL I S 1を検出した。なお、抗体は上記表3に記載したものをを用いた。

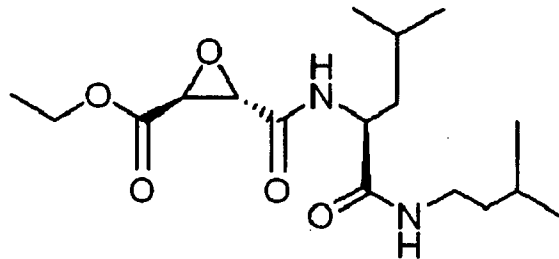
なお、以下にA L L N及びE 6 4 dの構造式を示す。

[化79]



<ALLN>

[化80]



<E64d>

- 5 結果を図23に示す。Lis1ヘテロ変異マウス胎児のLIS1タンパク質量は正常マウス胎児の半分程度であるところ、ALLN, E64dを投与してもLIS1タンパク質の量の改善は認められず、ALLN, E64dは滑脳症治療薬として期待できないことが分かった。

10 各カルパイン阻害剤の毒性の検討

- 生後4～5日目のFVBマウス(15匹)より小脳を切り出し、 Ca^{2+} -free Hank's balanced salt solution (CF-HBSS; Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Hank's balanced salt solution (CMF-HBBS, SIGMA) に5mM 塩化マグネシウム (MgCl_2 , Wako) および4 mg/mL Glucose (Wako) を含ませたもの) 内で髄膜を取り除き、細かく切断した。小脳片をCF-HBSSで洗浄後、0.025%

トリプシン (invitrogen) および $6.25 \mu\text{g}/\text{mL}$ Deoxyribonuclease (DNase, SIGMA) を含む CF-HBSS 内にて 37°C で 20 分放置して、遠心した。得られた組織を 10% HS/BME (DNase Medium) (10% Horse Serum (HS, invitrogen) を含む Basal Medium Eagle (BME, invitrogen) (10% HS/BME) に 5mM MgCl_2 および $25 \mu\text{g}/\text{mL}$ DNase を添加したもの) で洗浄・遠心し、細胞に DNase Medium を加えて 24well-plate (nunc) に移し、5% CO_2 を含む大気下 37°C で 30 分静置し、細胞を浮遊させた。細胞浮遊液を回収後 10% HS/BME で洗浄し、再び 24well-plate に移し 5% CO_2 を含む大気下 37°C で 16 時間培養した。細胞を 1% Bovine Serum Albumin (BSA, SIGMA) および 0.5% N2 supplement (invitrogen) を含む BME 内に回収し、細胞浮遊液を、あらかじめ Poly-L-lysine (SIGMA) および Laminin (SIGMA) でコートした 35mm Glass Base Dish (IWAKI) に、 5×10^5 cells/mL となるようにまき、5% CO_2 を含む大気下 37°C で 8 時間培養した。培養された神経細胞を被験神経細胞とした。

SNJ-1945、E64d、又は ALLN を含む培養液 (10% HS/BME) を次のようにして調製した。DIMETHYL SULFOXIDE (SIGMA D-5879) に溶解した SNJ-1945 を培養液に最終濃度 $200 \mu\text{M}$ となるように混合し、1 時間 37°C に静置し、SNJ-1945 を培地に完全に溶解させた。ALLN と E64d も同様に培地に溶解させた。但し、ALLN と E64d はそれぞれ最終濃度が $50 \mu\text{M}$ と $100 \mu\text{M}$ になるように、培地に添加した。

用意していた被験神経細胞に、各化合物が溶けた培地を $2\text{mL}/\text{well}$ で加えて、16 時間培養を行った。またコントロールとして、同量の DIMETHYL SULFOXIDE (SIGMA D-5879) を添加した培地を用いて同様に培養を行った。培養後、細胞を倒立型顕微鏡 (TCS FP5S, Leica) で観察した。対物レンズは 20 倍のものを使用した。画像の撮影には専用ソフトウェア (LAS AF, Leica) を使い、 512×512 pixel の条件で撮影した。結果を図 24 に示す。

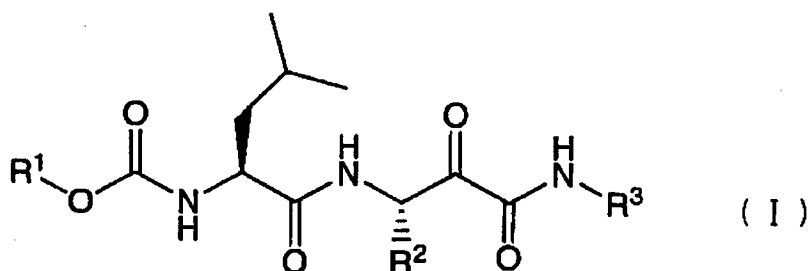
図24に示されるように、DIMETHYL SULFOXIDE (DMSO) のみを添加したコントロールの細胞では、神経突起が正常に伸長し、細胞の遊走が起こって、細胞が周囲に拡散していた。SNJ1945を添加した細胞も、神経突起が伸展し、細胞が遊走しており、コントロールとの差はなかった。一方、ALLNを添加した細胞では、細胞が丸く凝集しており、神経突起を伸ばしているものはほとんどなかった。細胞は中央に集積したままで、遊走もほとんど観察できなかった。E64dを添加した細胞も同様に、中央に凝集しており、突起をのばすことができない細胞が多かった。遊走もコントロールに比較するとほとんど起こらず、周辺部への細胞の移動はわずかだった。このことから、SNJ-1945は、他のカルパイン阻害剤に比べて、高い濃度でも細胞毒性がまったく観察されず、細胞に対する安全性が高いことが確認できた。

請求の範囲

【請求項1】

一般式 (I)

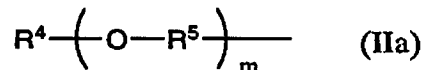
[化1]



5

[式中、R¹は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式 (I I a)

[化2]

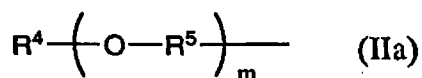


- 10 (式中、R⁴は低級アルキル基、R⁵は低級アルキレン基、mは1～6の整数を示す。)で示される基を示す。R²はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。R³は低級アルキル基 (ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。)で表される化合物を含有する、滑脳症治療又は予防剤。

15 【請求項2】

R¹が、式 (I I a)

[化3]



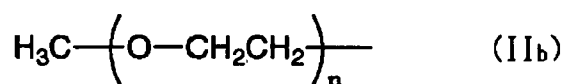
(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。)

で示される基である、請求項1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

【請求項3】

5 R^1 が、式 (IIb)

[化4]



(式中、 n は1～6の整数を示す。) で示される基である、請求項1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

10 【請求項4】

R^1 で示される低級アルキル基上に置換した複素環基が、低級アルキル基を有していてもよいピリジルである、請求項1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

【請求項5】

R^1 で示される複素環基のヘテロ原子が酸素原子である、請求項1に記載の滑脳症治療

15 又は予防剤。

【請求項6】

R^3 で示される低級アルキル基がシクロプロピル基である、請求項1～5のいずれかに記載の滑脳症治療又は予防剤。

【請求項7】

20 一般式 (I) で表される化合物が、

((1S) -1- (((1S) -1-ベンジル-2, 3-ジオキソ-3- (シクロプロピルアミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸2-メトキシエチルエステル、

((1S) -1- (((1S) -1-ベンジル-2, 3-ジオキソ-3- (シクロプロピルアミノ) プロピル) アミノ) カルボニル) -3-メチルブチル) カルバミン酸5-メトキシ-3-オキサペンチルエステル、

25

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸8-メトキシ-3,6-ジオキサオクチルエステル、

5 ((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-2,3-ジオキソ-3-(シクロプロピルアミノ)プロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸11-メトキシ-3,6,9-トリオキサウンデカニルエステル、又は

((1S)-1-(((1S)-1-ベンジル-3-(シクロプロピルアミノ)-2,3-ジオキソプロピル)アミノ)カルボニル)-3-メチルブチル)カルバミン酸2-(ピリジン-2-イル)エチルエステルである、

10 請求項1に記載の滑脳症治療又は予防剤。

【請求項8】

経口剤、注射剤、又は点滴剤である、請求項1～7のいずれかに記載の滑脳症治療又は予防剤。

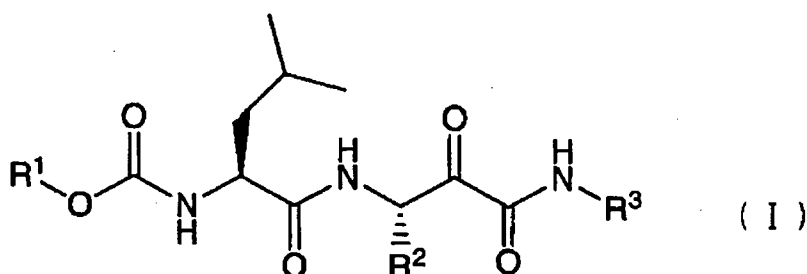
【請求項9】

15 一般式(I)で表される化合物50～1200mgが、滑脳症患者に対して2～5日あたり1回投与されるように用いられることを特徴とする、請求項1～8のいずれかに記載の滑脳症治療又は予防剤。

【請求項10】

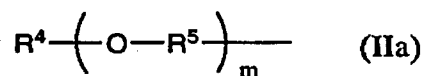
一般式(I)

20 [化5]



[式中、R¹は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式(I I a)

[化6]

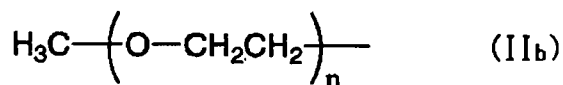


(式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。)で示される基を示す。 R^2 はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。 R^3 は低級アルキル基(ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。)で表される化合物を、滑脳症患者又は滑脳症胎児を妊娠した妊婦へ投与する工程を含む滑脳症治療方法、あるいは、妊婦へ投与する工程を含む滑脳症予防方法。

【請求項11】

10 R^1 が、式(IIb)

[化7]

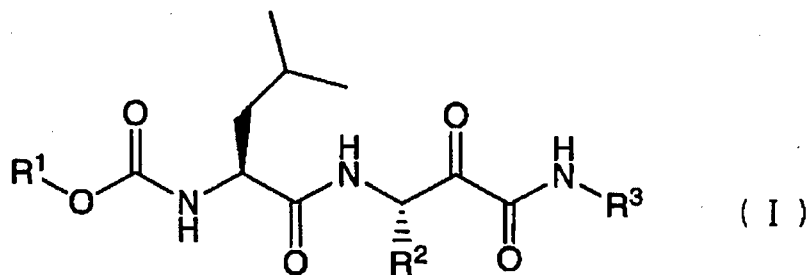


(式中、 n は1～6の整数を示す。)で示される基である請求項10に記載の滑脳症治療方法又は予防方法。

15 【請求項12】

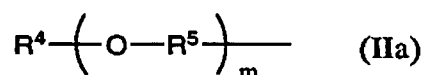
滑脳症の治療又は予防における使用のための、一般式(I)

[化8]



〔式中、 R^1 は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式 (I I a)

〔化9〕

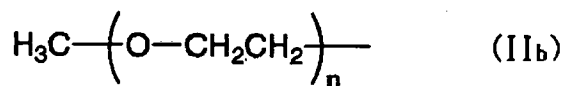


- 5 (式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。) で示される基を示す。 R^2 はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。 R^3 は低級アルキル基 (ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。) で表される化合物、又は該化合物を含む医薬組成物。

10 【請求項13】

R^1 が、式 (I I b)

〔化10〕



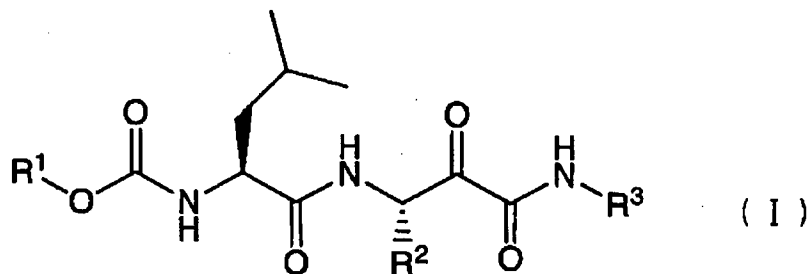
(式中、 n は1～6の整数を示す。) で示される基である請求項12に記載の化合物、

- 15 又は医薬組成物。

【請求項14】

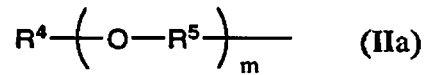
滑脳症の治療又は予防のための医薬の製造における、一般式 (I)

〔化11〕



[式中、 R^1 は、低級アルコキシ基で置換された低級アルキル基、複素環基で置換された低級アルキル基、複素環基、又は式 (I I a)

[化12]

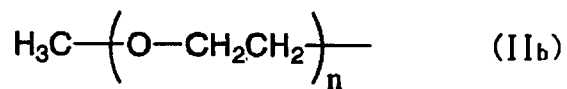


- 5 (式中、 R^4 は低級アルキル基、 R^5 は低級アルキレン基、 m は1～6の整数を示す。)で示される基を示す。 R^2 はフェニル基で置換されていてもよい低級アルキル基を示す。 R^3 は低級アルキル基(ハロゲン、低級アルコキシ基又はフェニル基で置換されていてもよい)、縮合多環式炭化水素基、又は水素原子を示す。)で表される化合物の使用。

10 【請求項15】

R^1 が、式 (I I b)

[化13]



(式中、 n は1～6の整数を示す。)で示される基である請求項14に記載の使用。

1

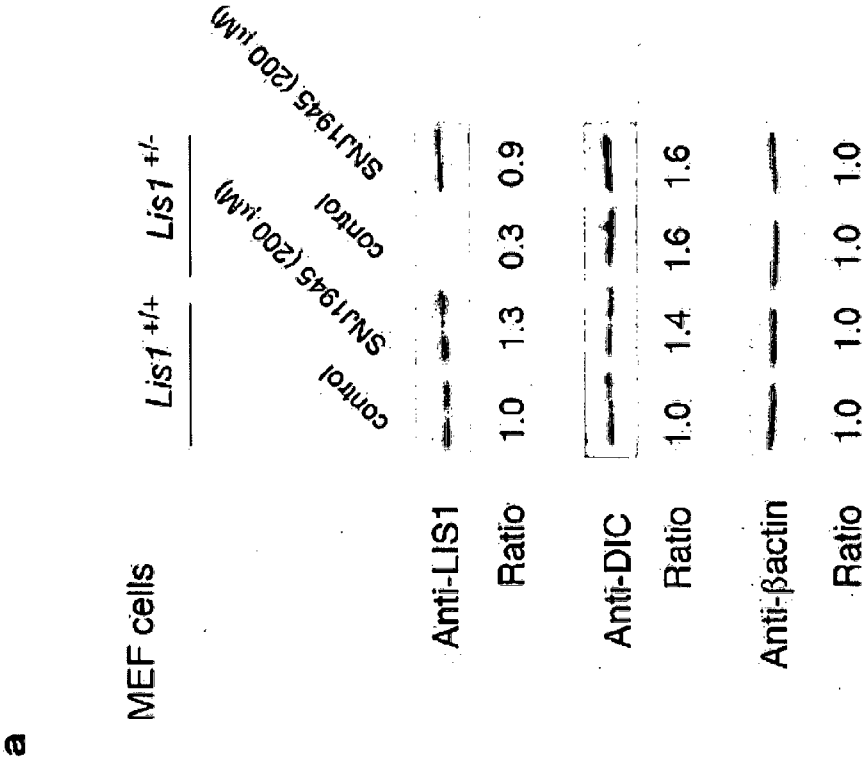
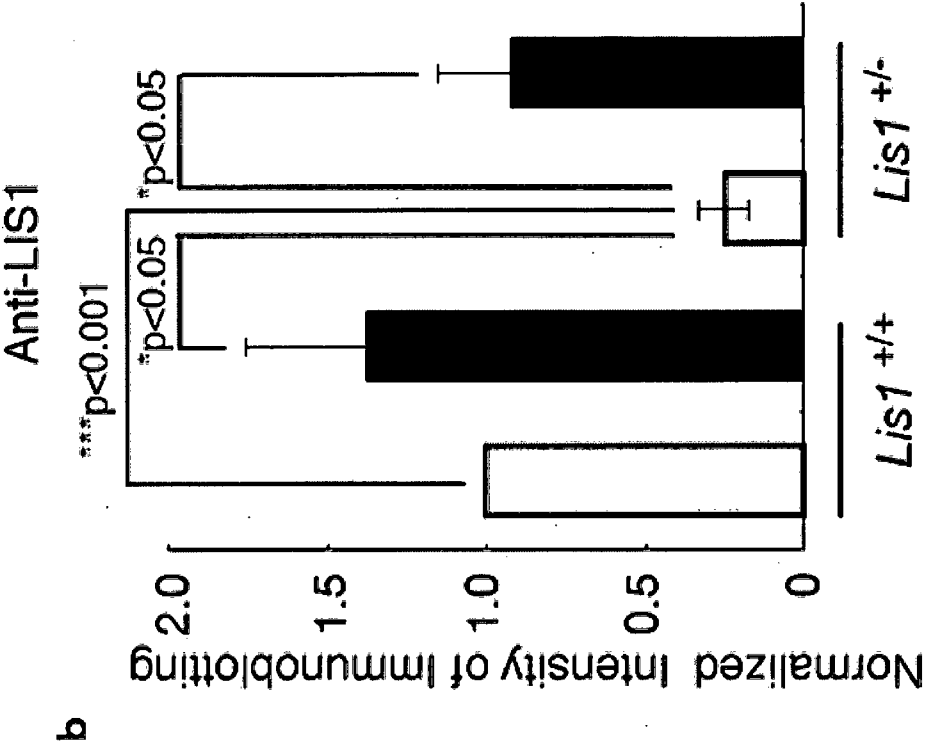
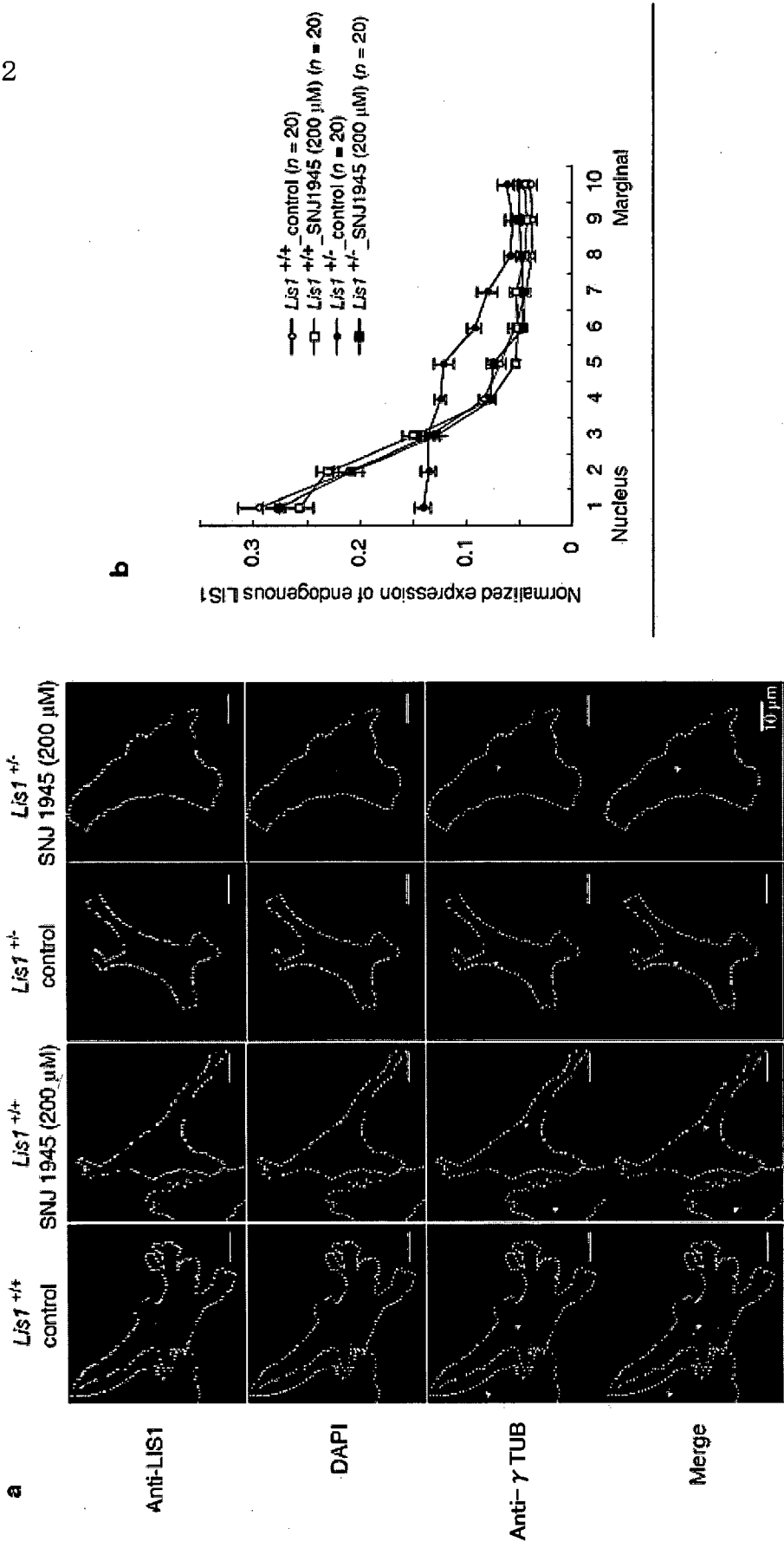
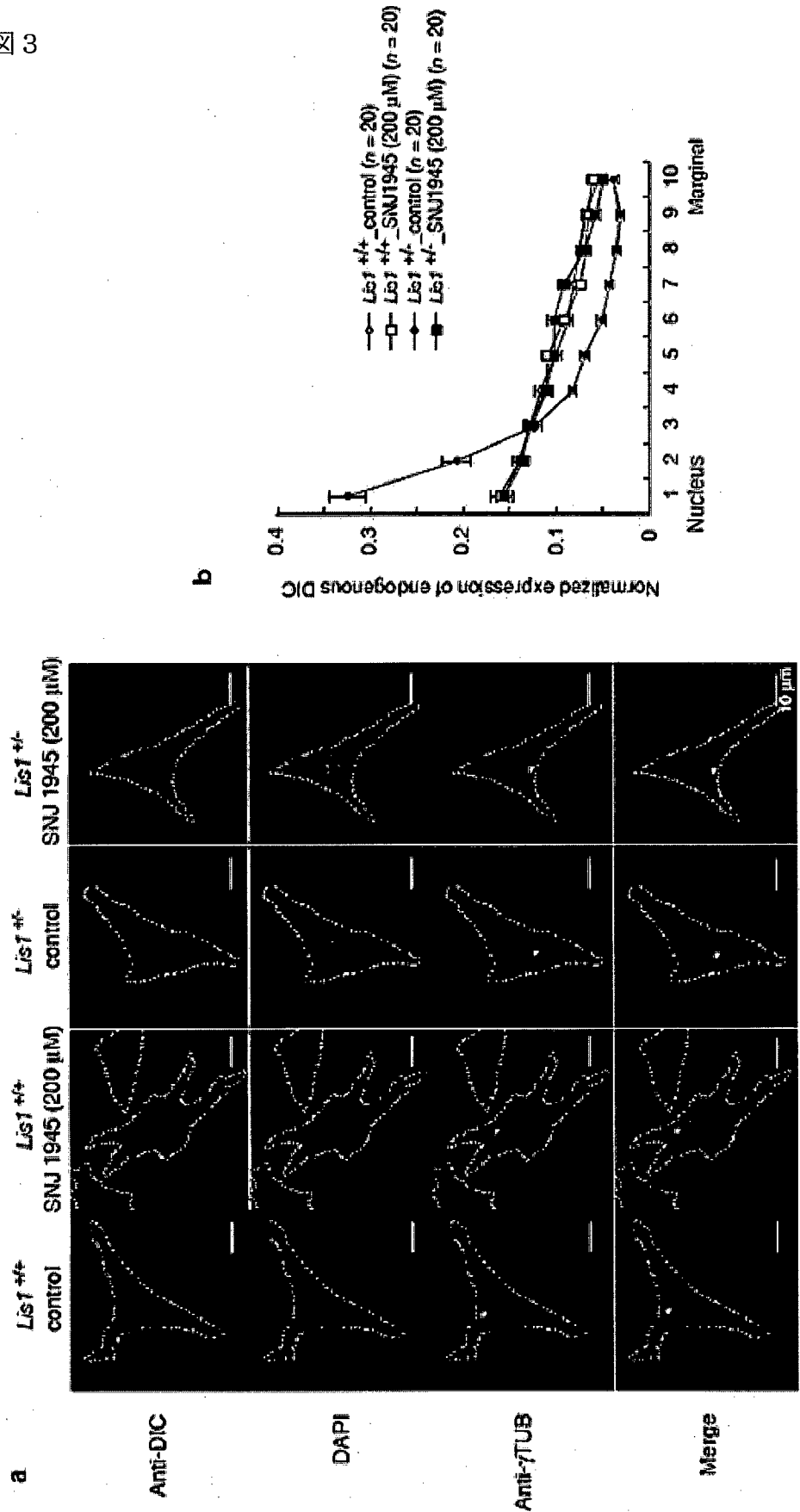


図 2

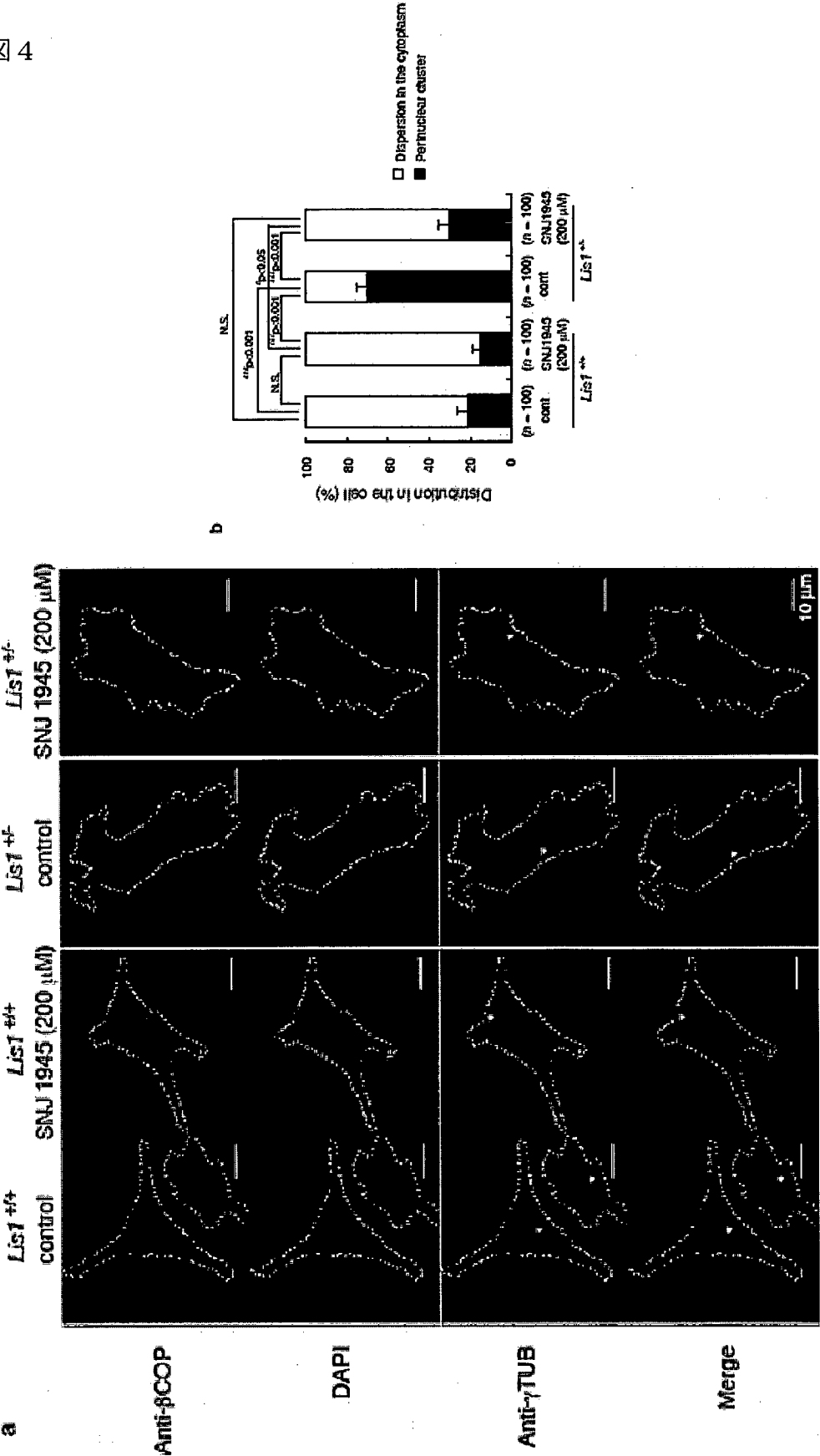


3

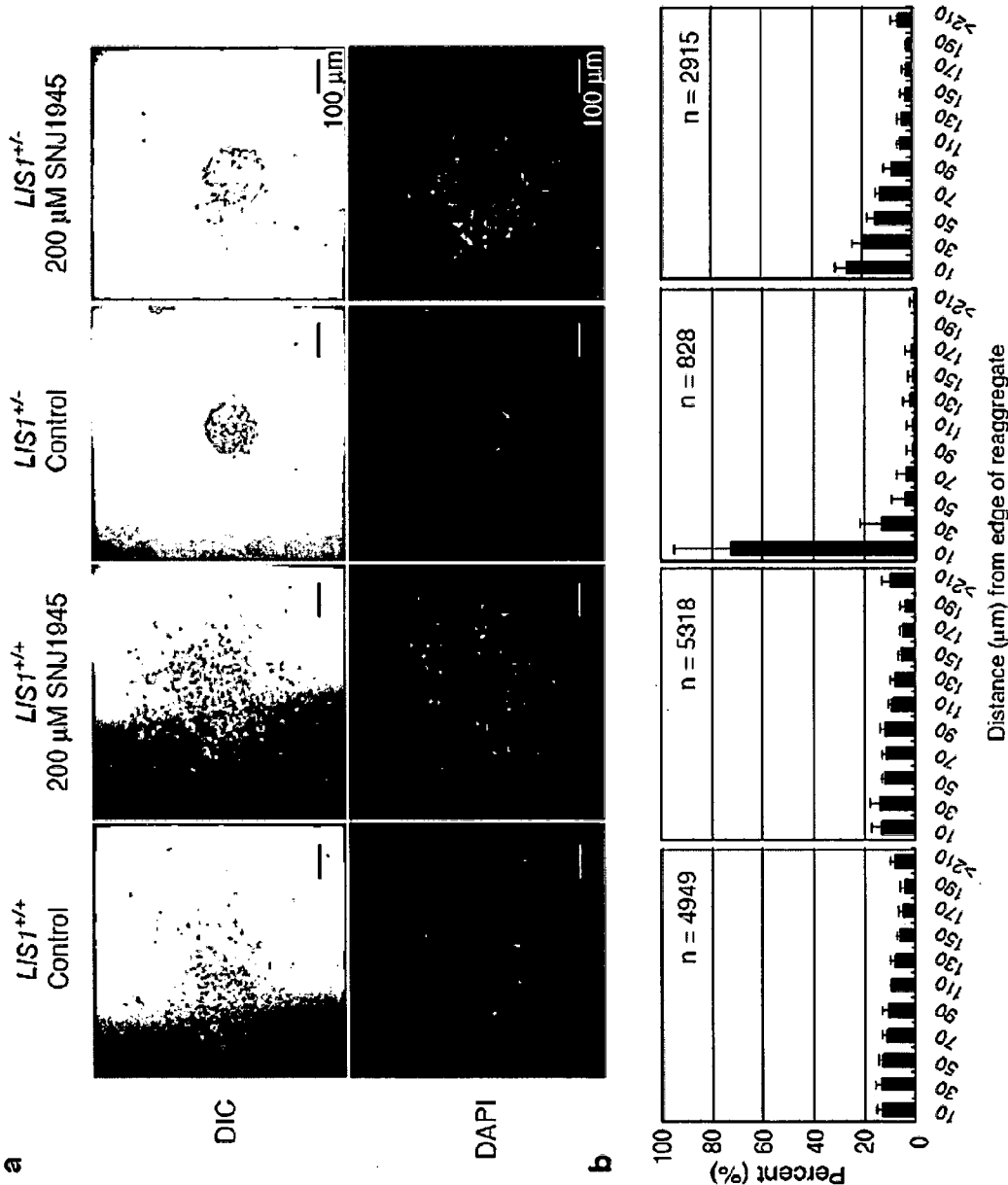


4/24

4

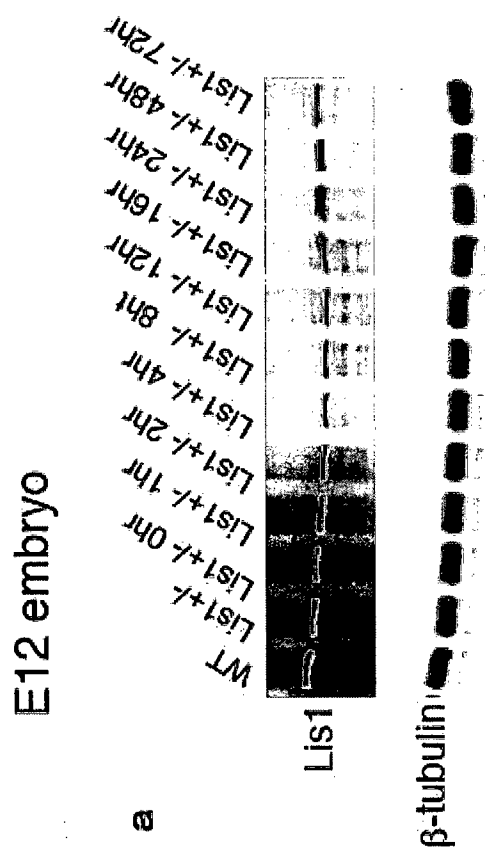
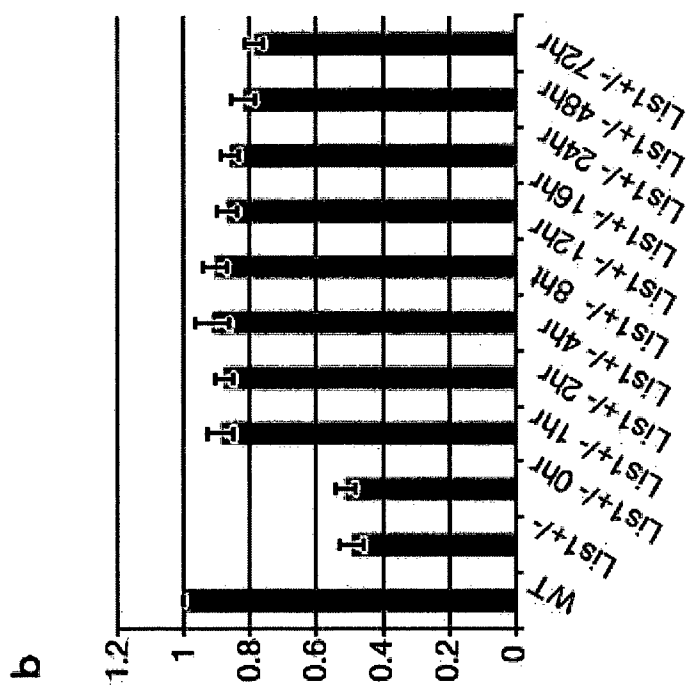


5



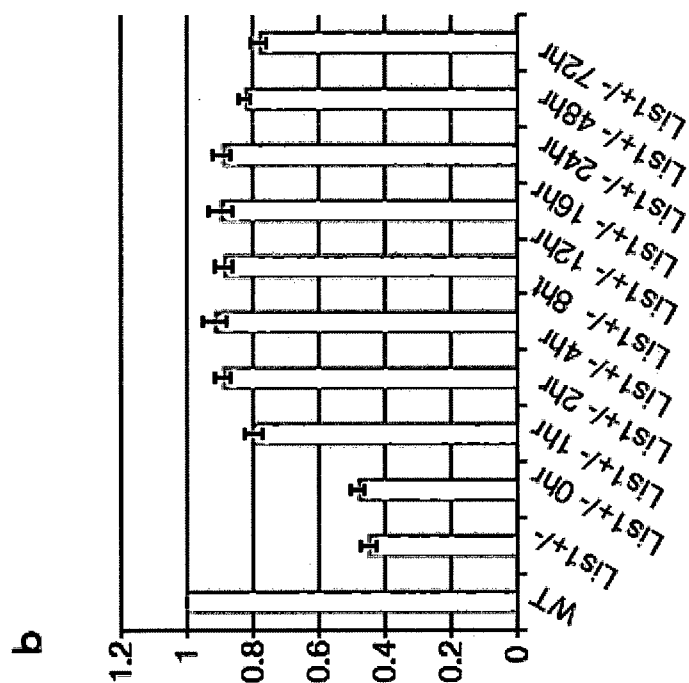
6/24

6

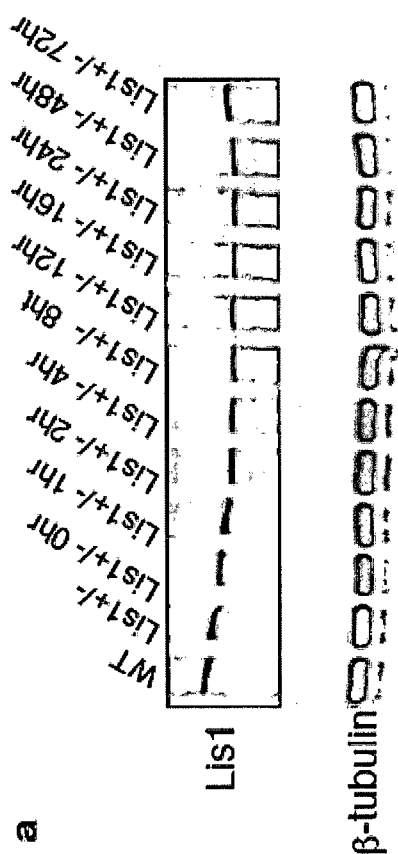


7/24

図 7



P1 neonatal



8/24

图 8

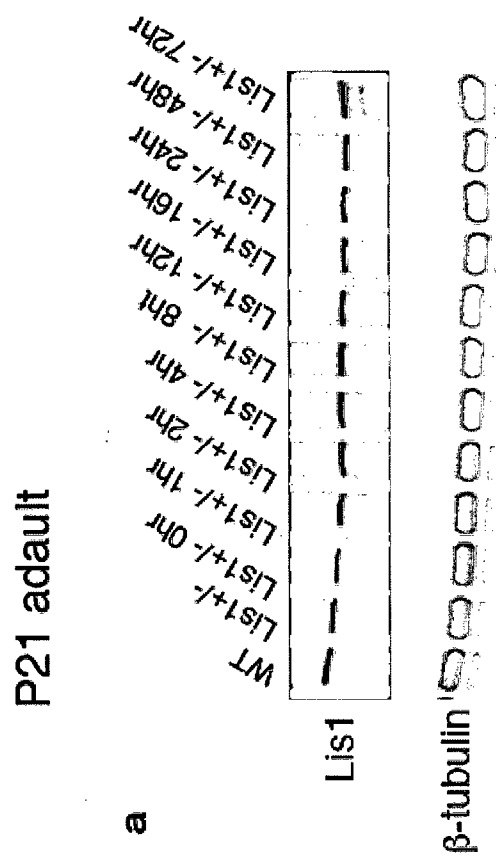
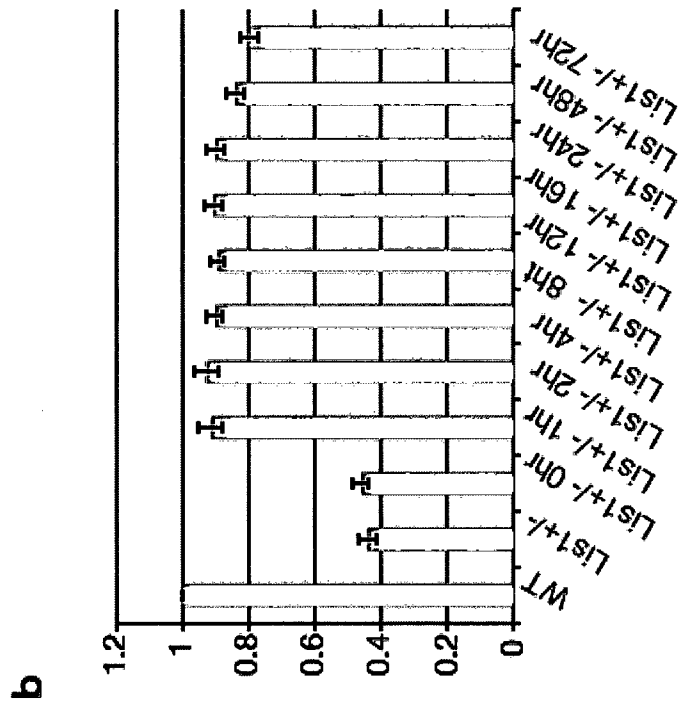
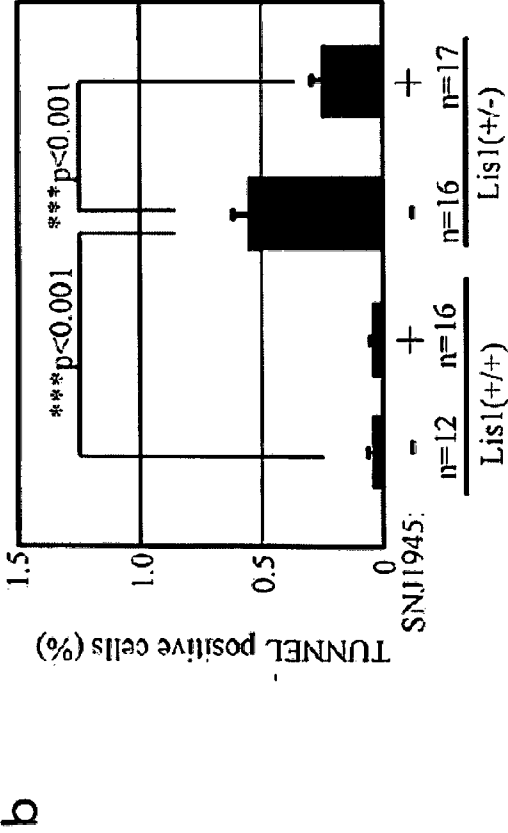
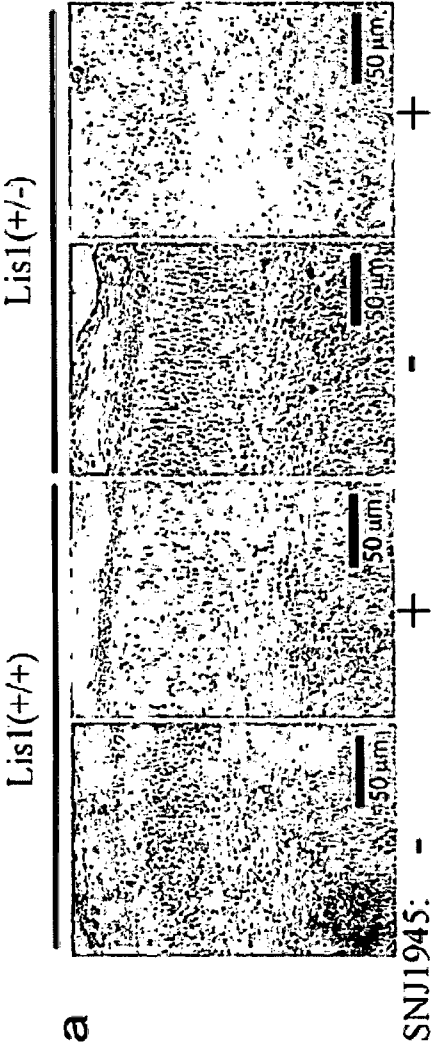
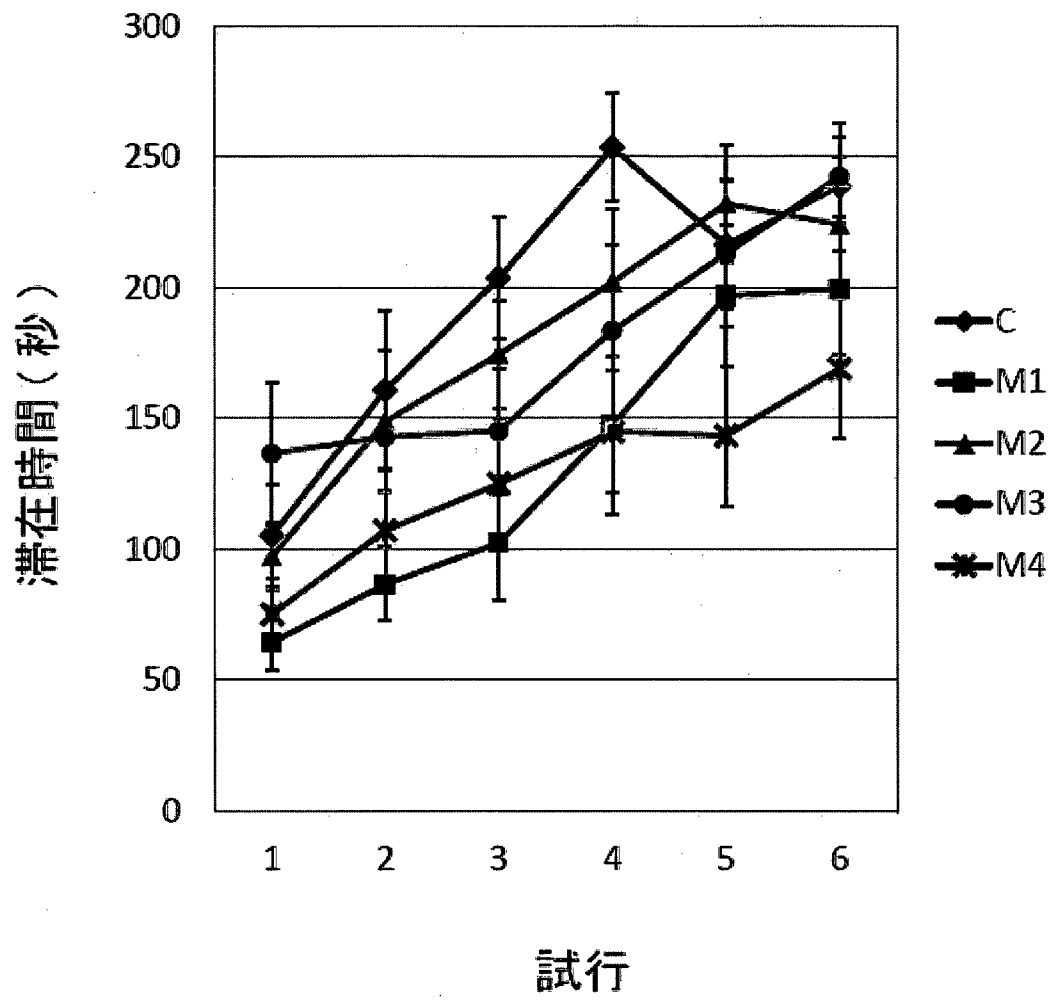


図 9



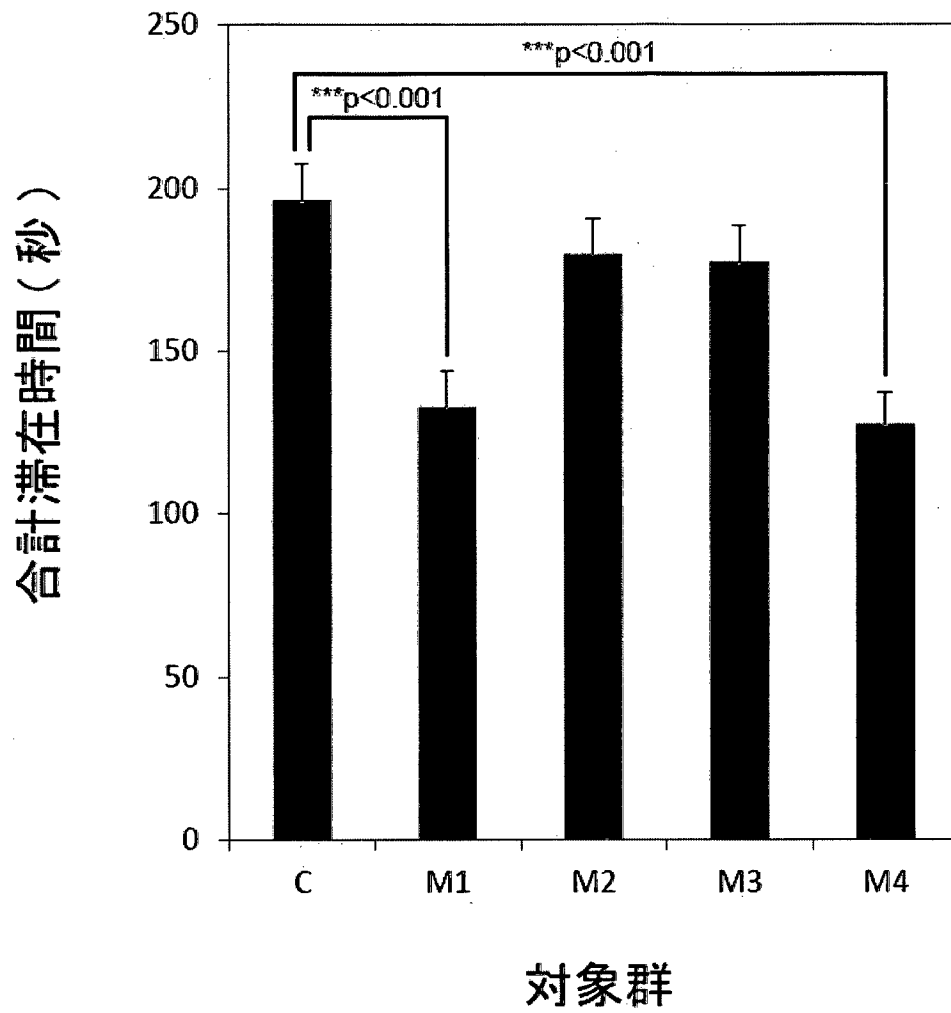
10/24

図 1 0



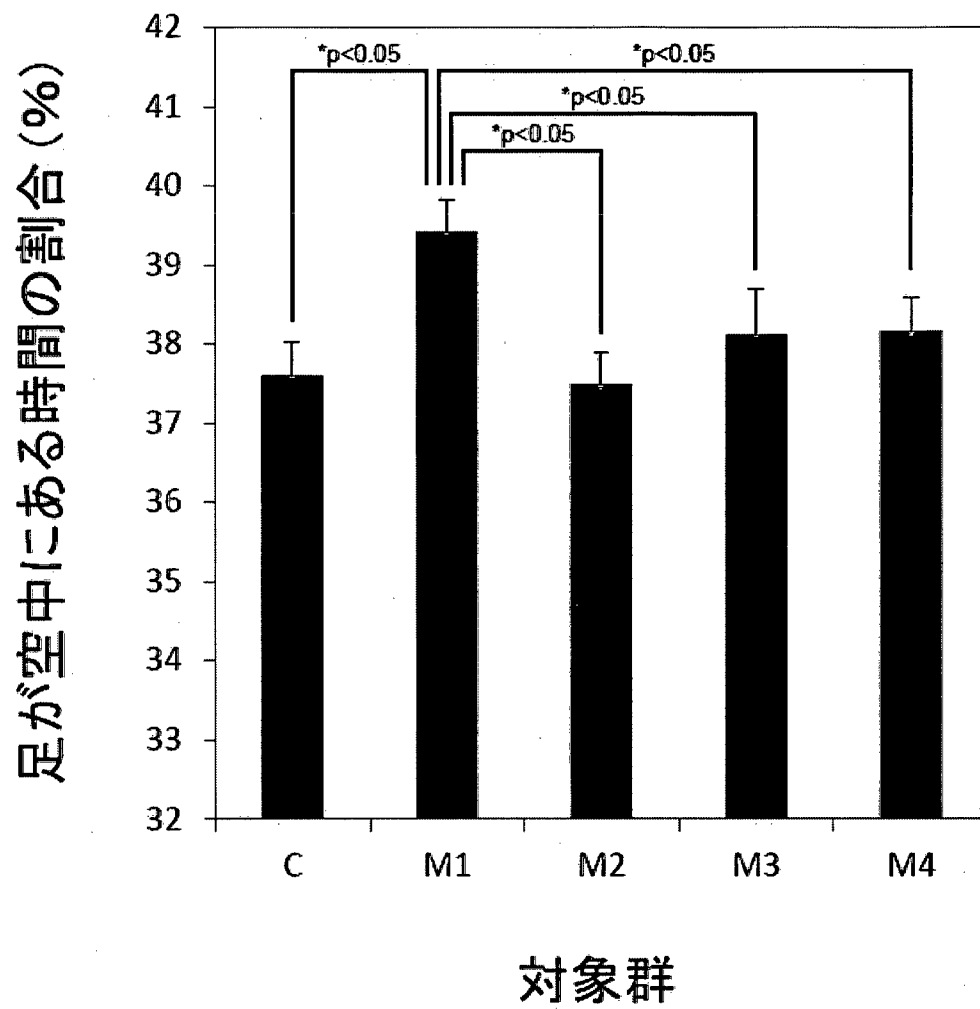
11/24

図 1 1



12/24

図 1 2



13/24

図 13

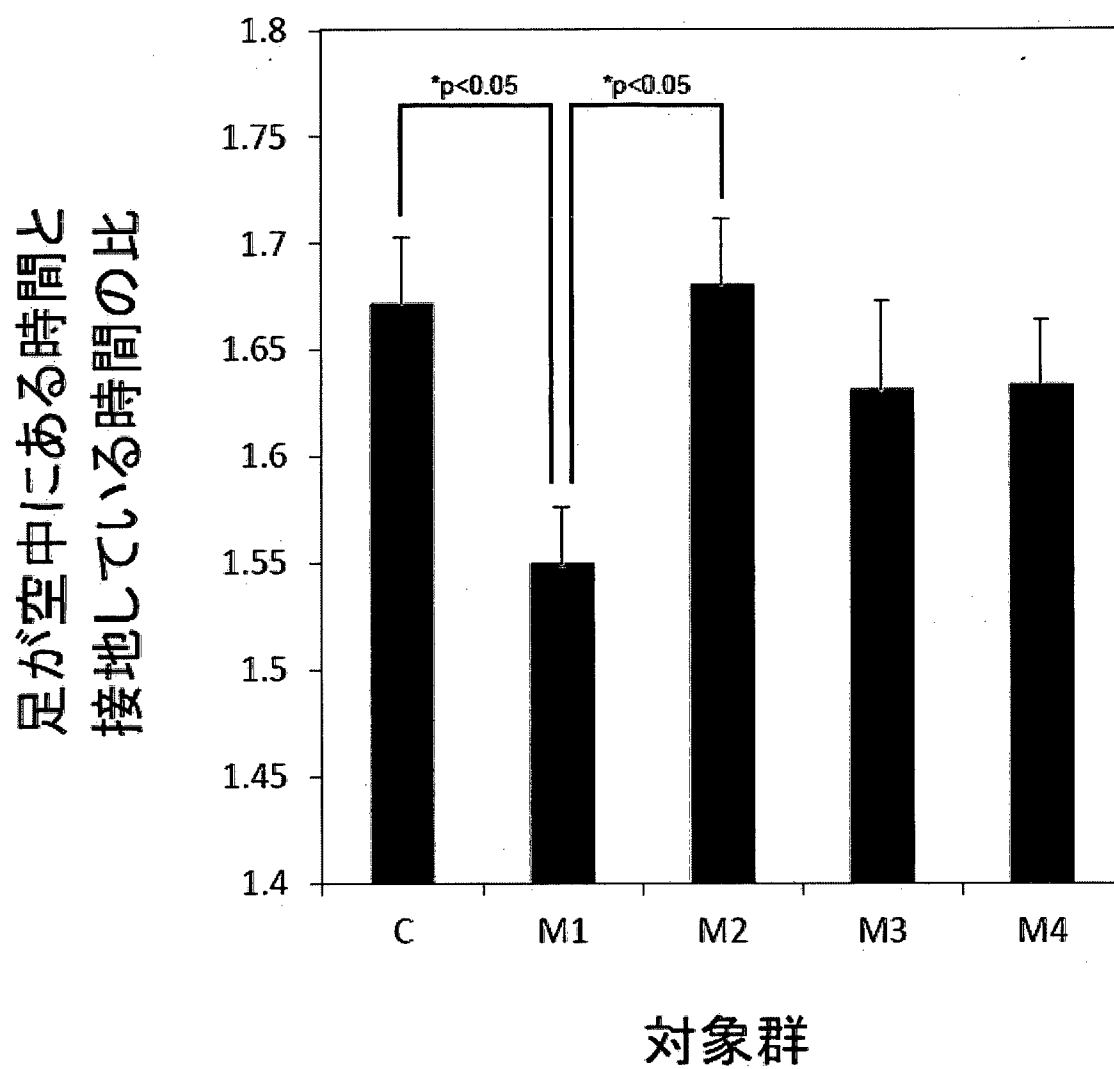


図 14

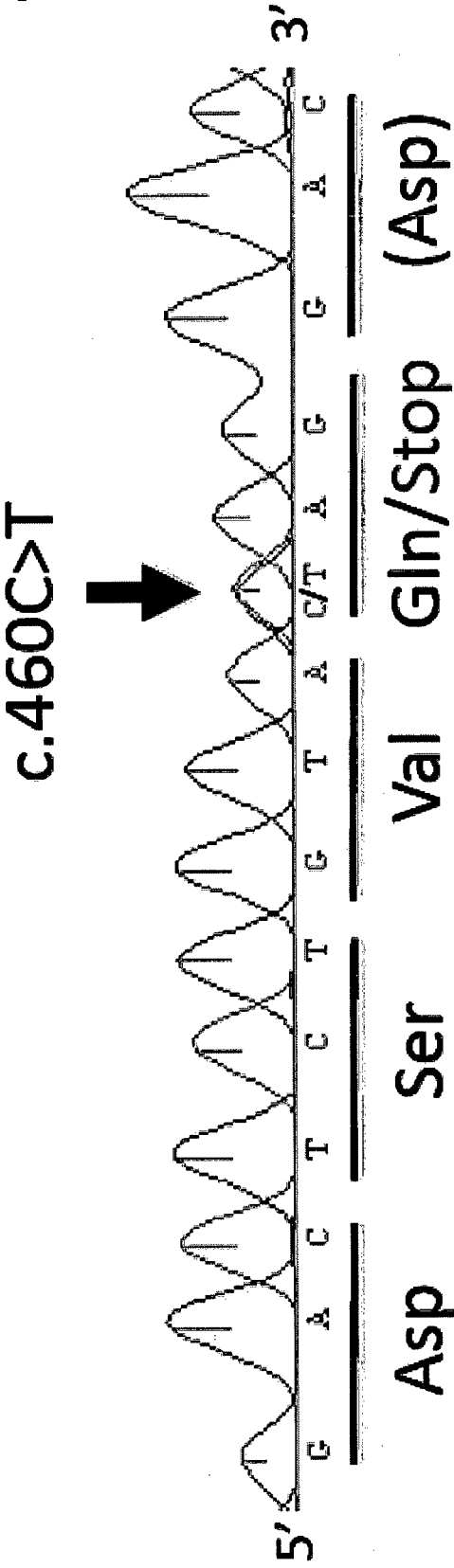
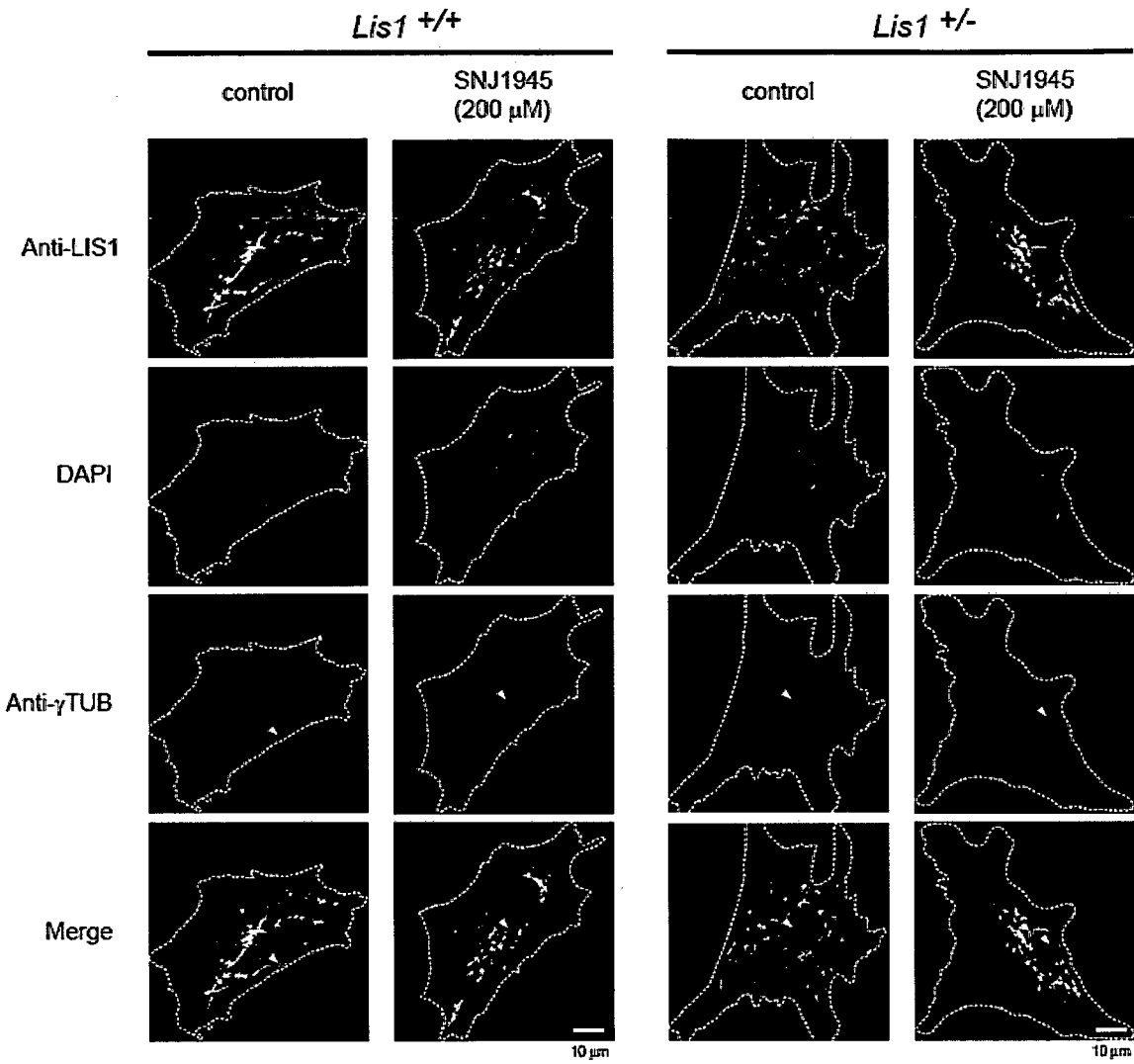


図 1 5



16/24

図 1 6

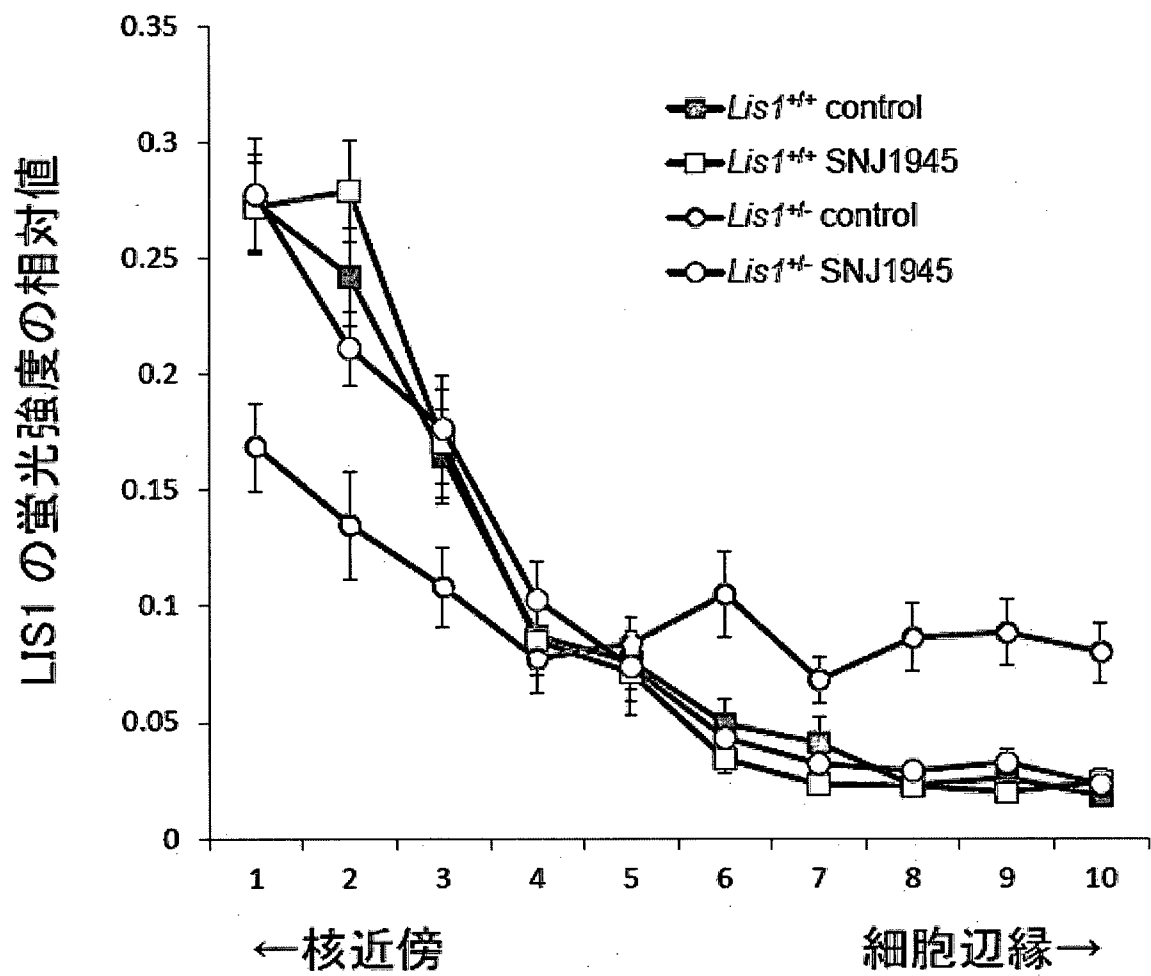
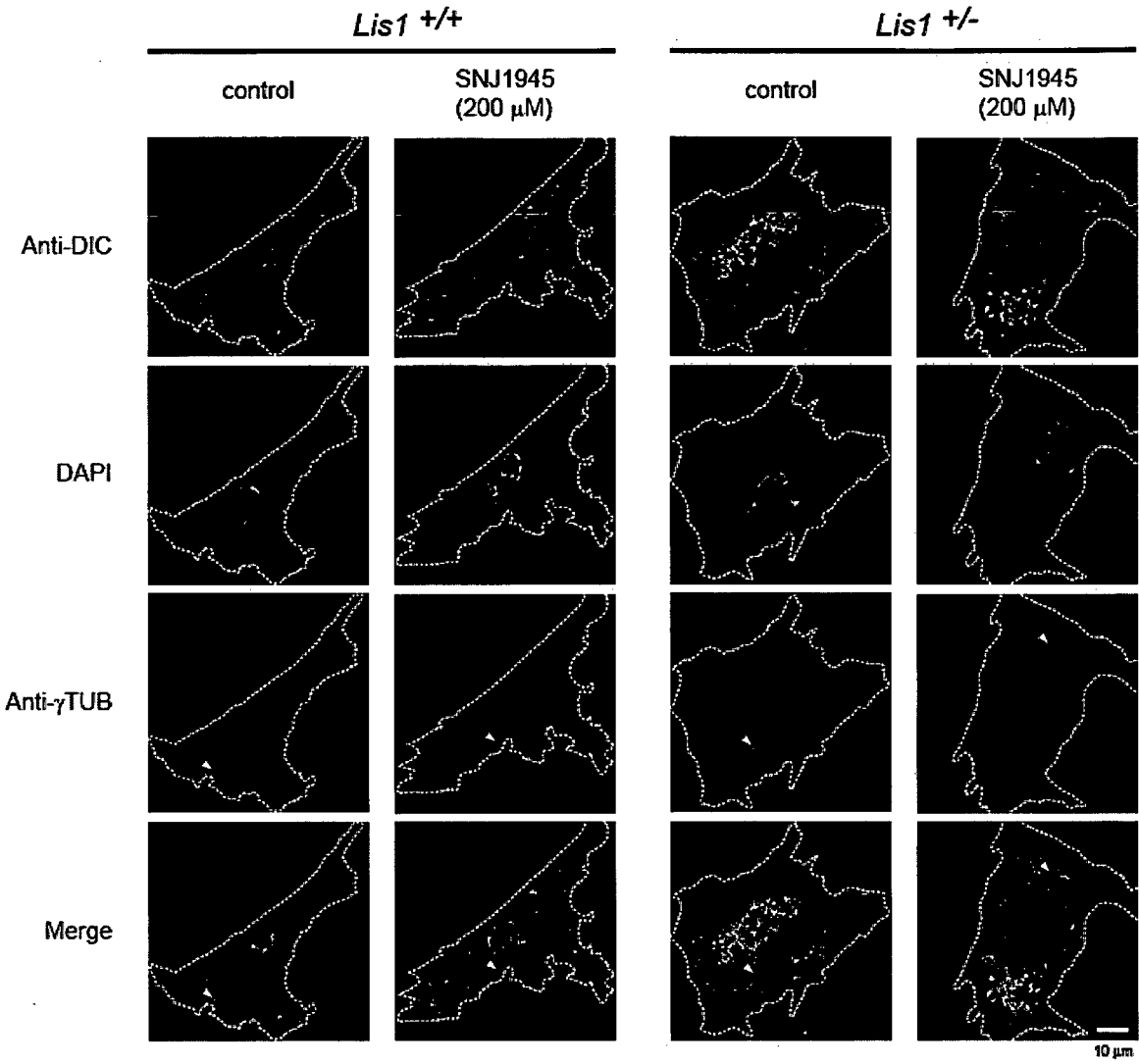


図 1 7



18/24

図 18

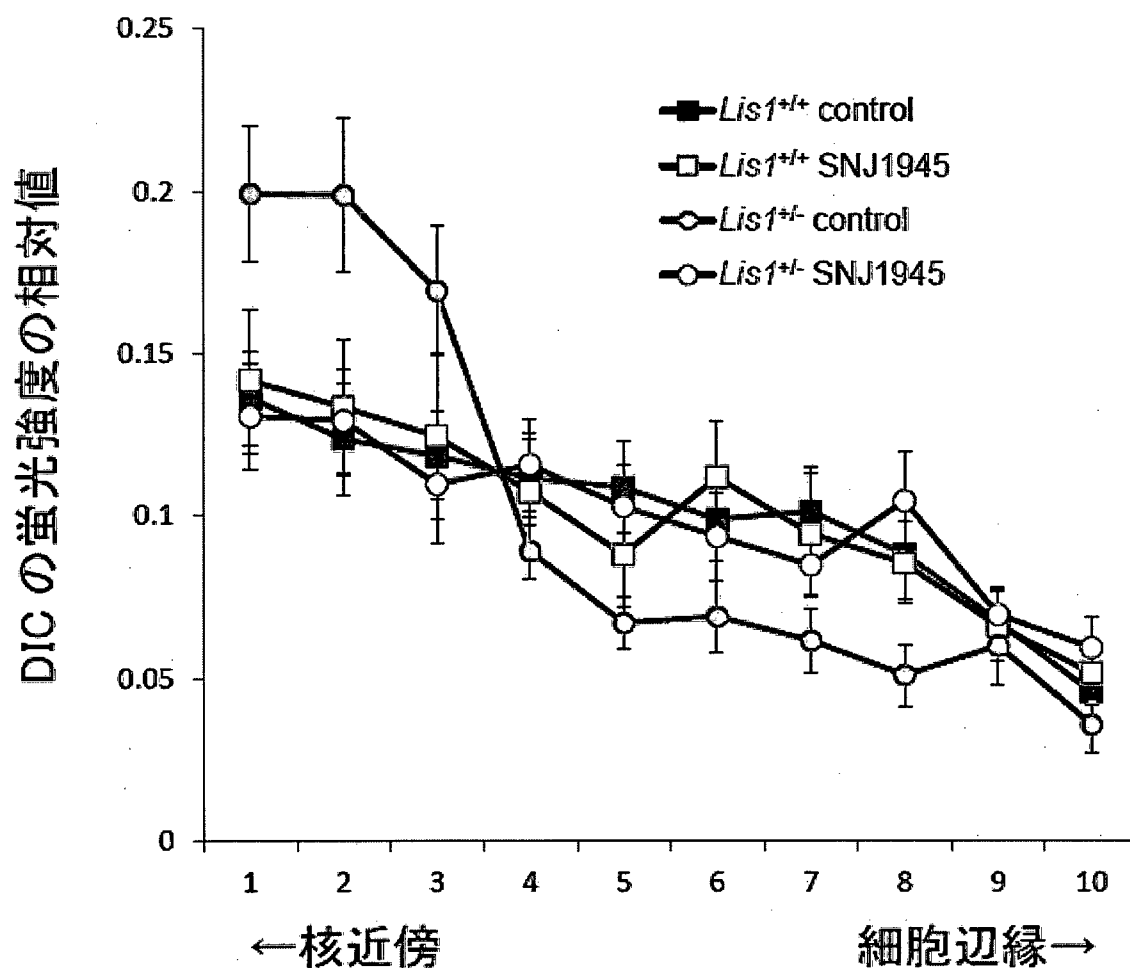
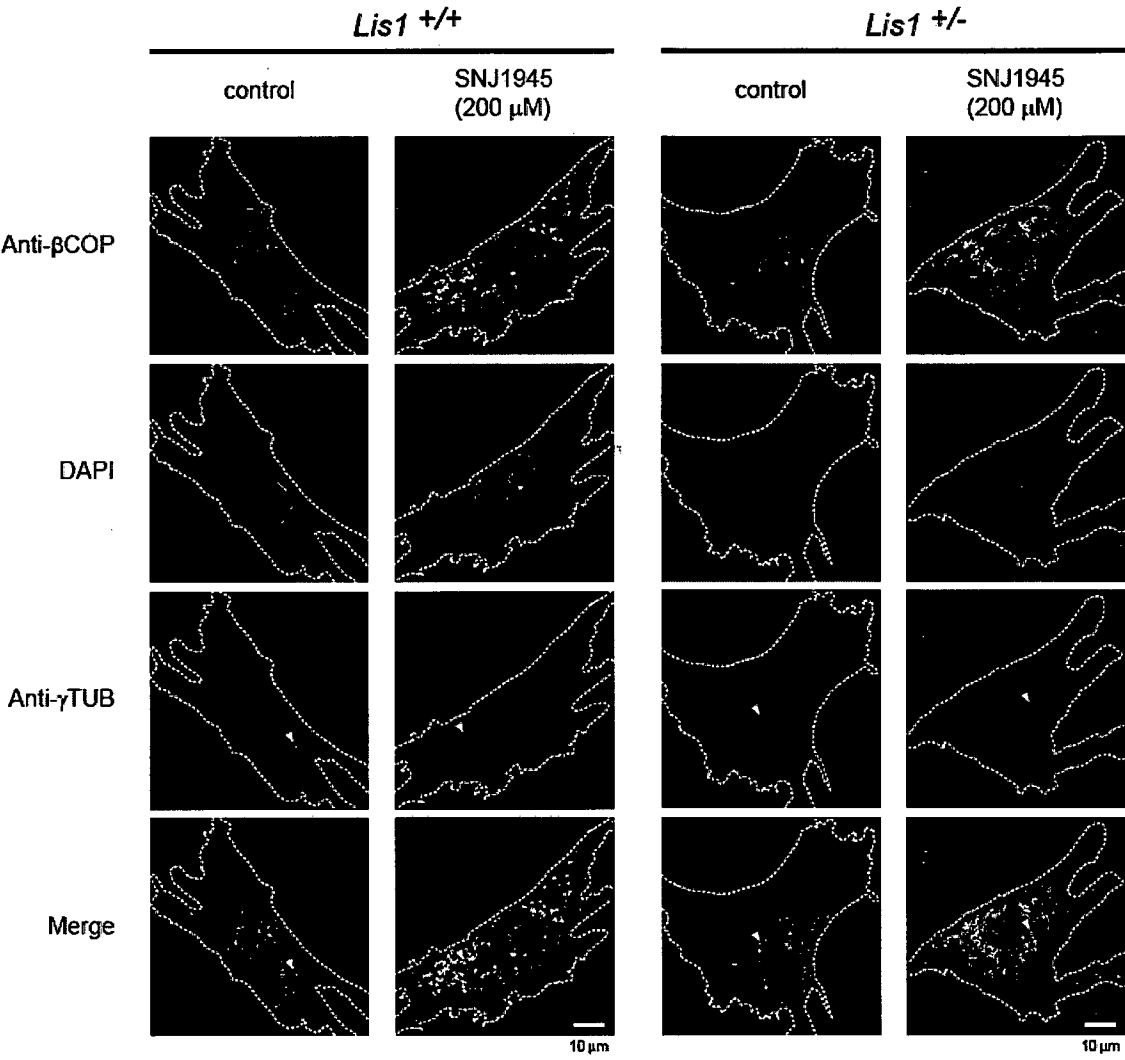


Figure 19



20/24

図 20

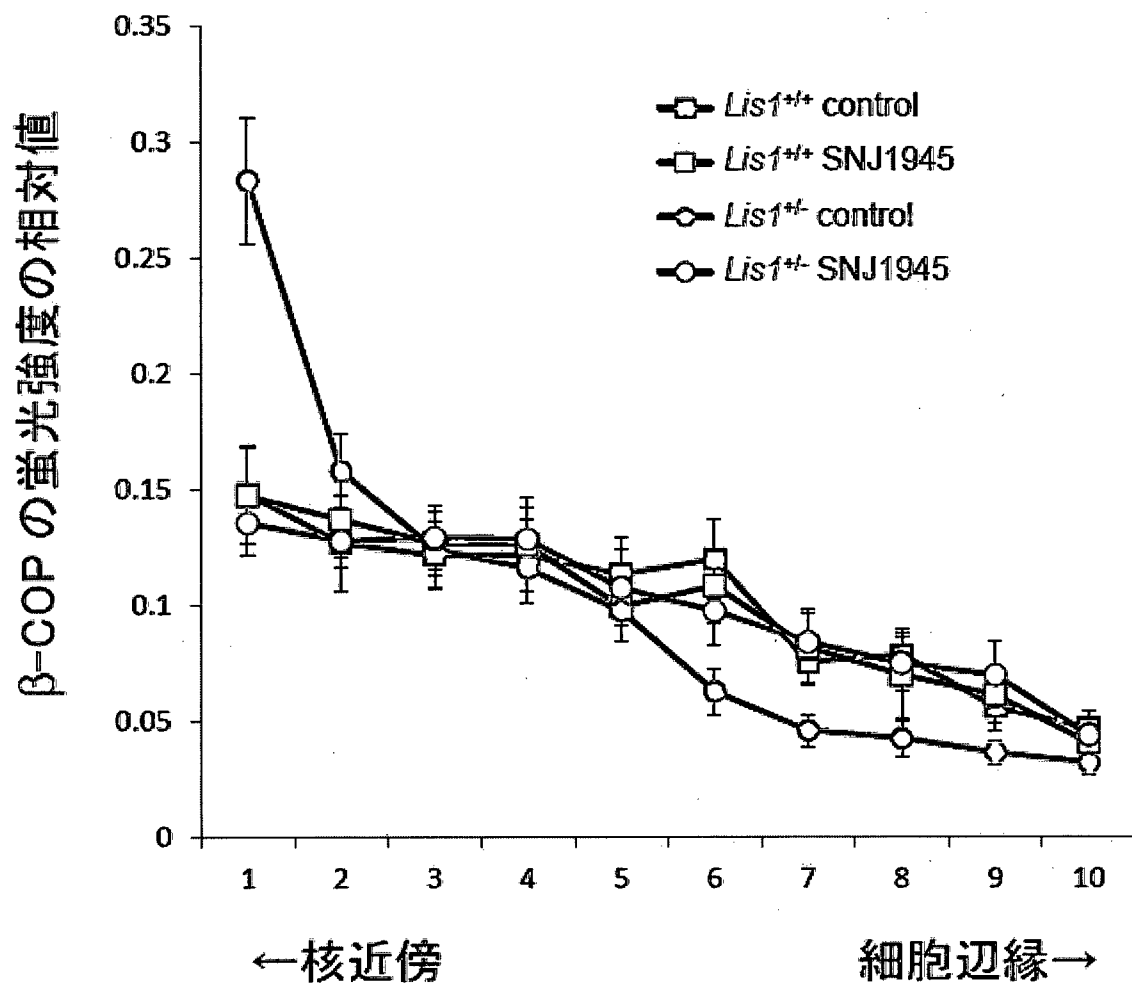
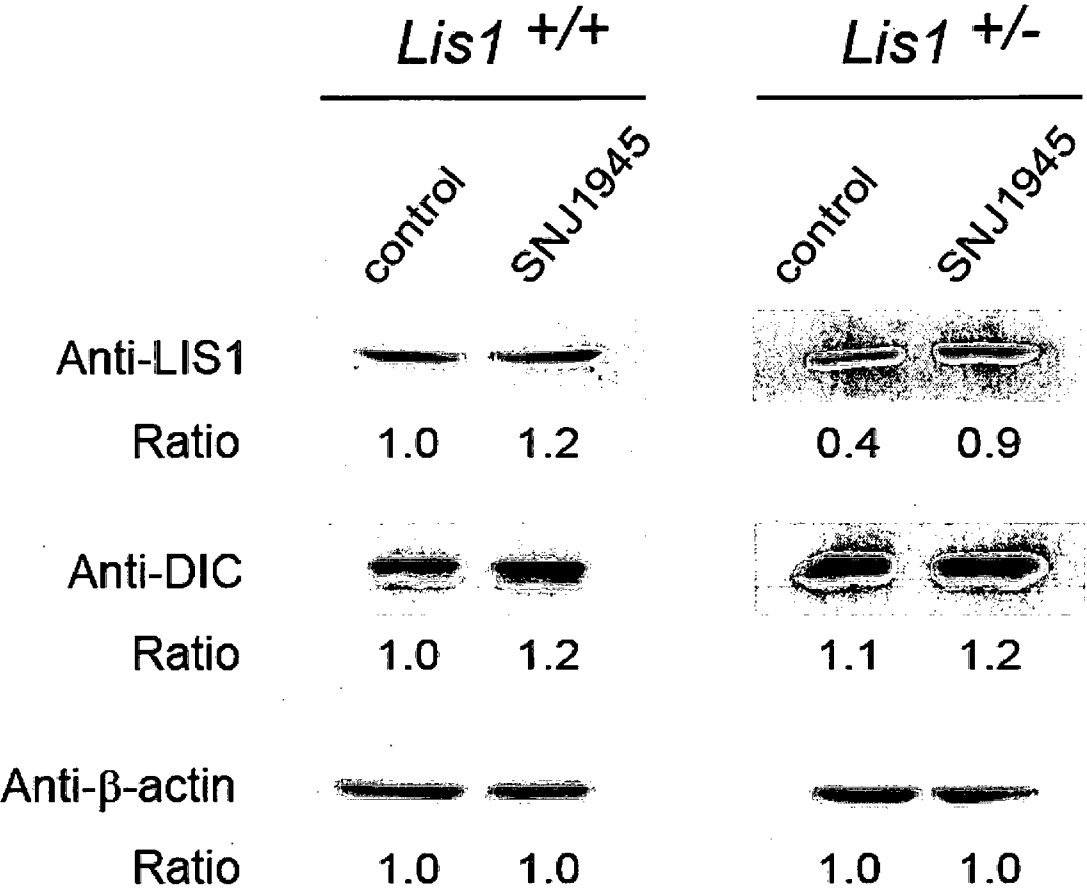


図 2 1



22/24

図 2 2

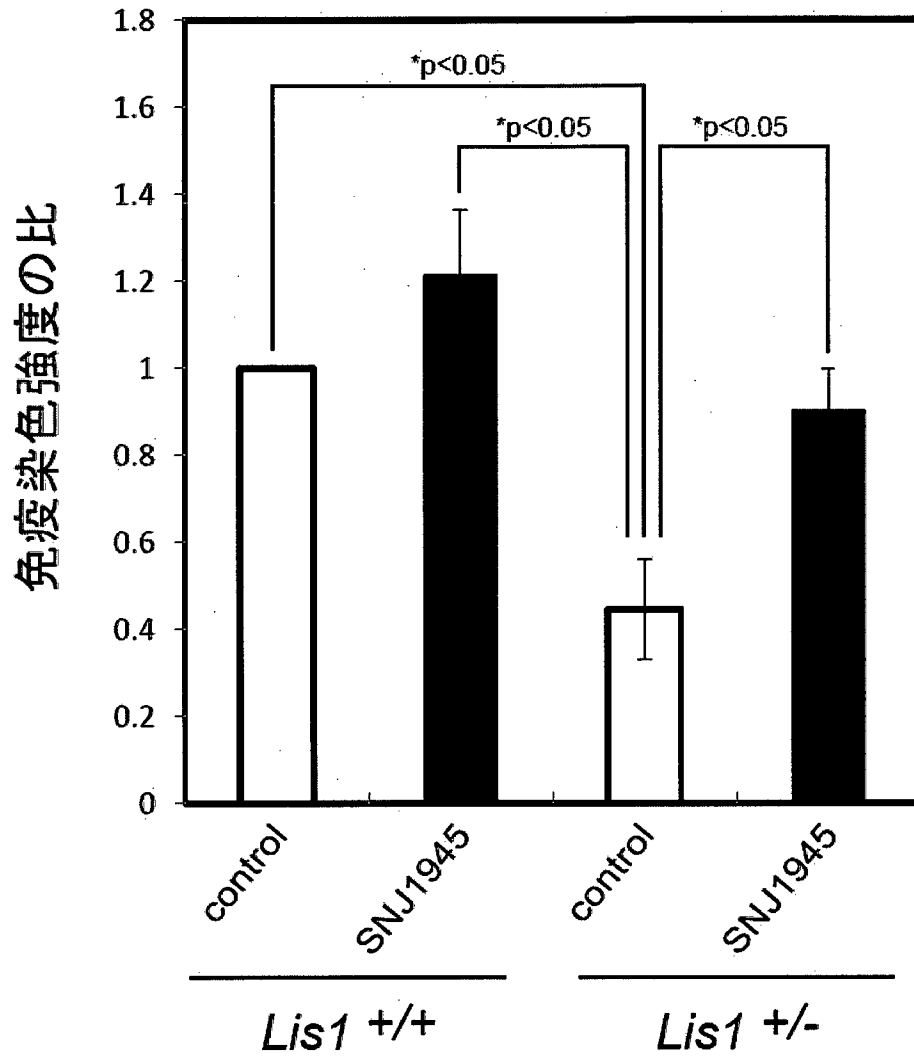
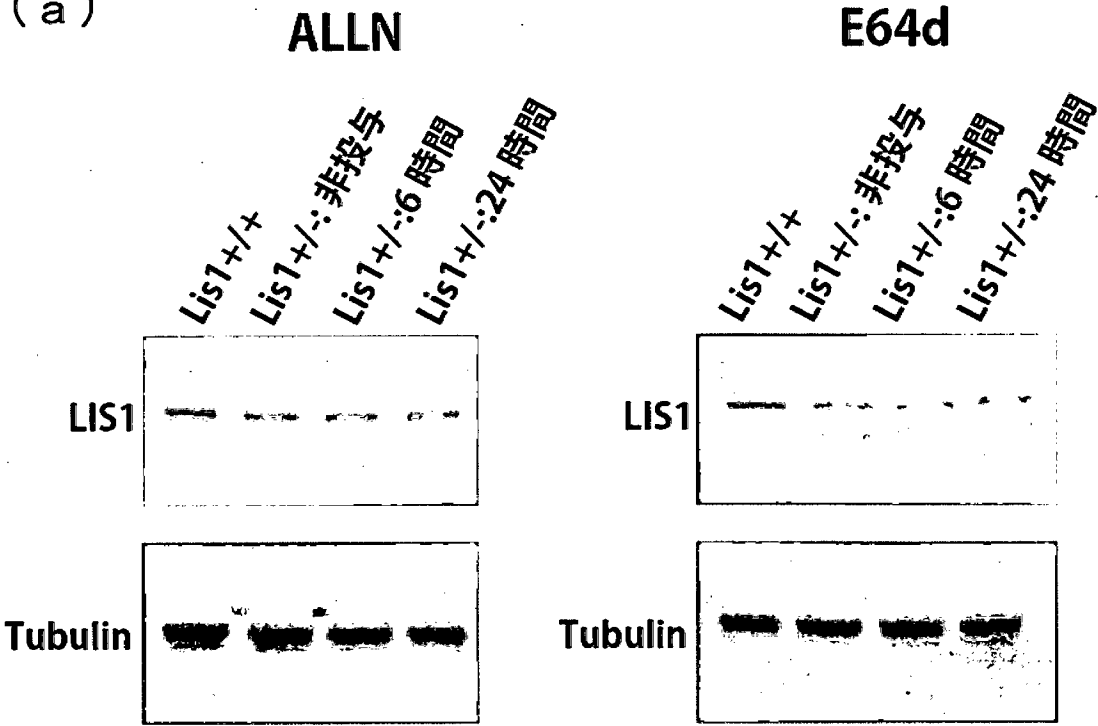


図 2 3
(a)



(b)

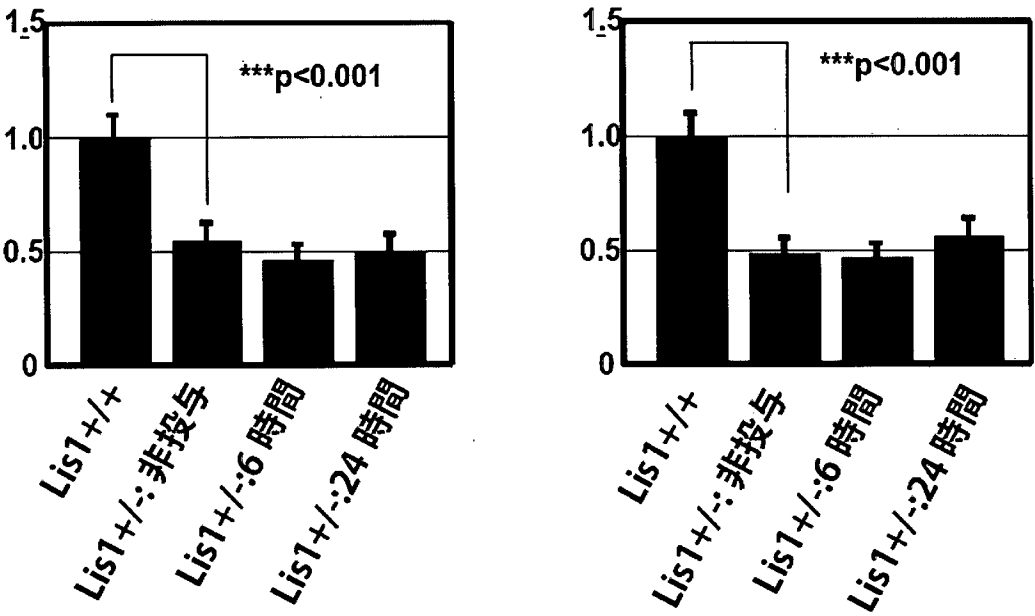
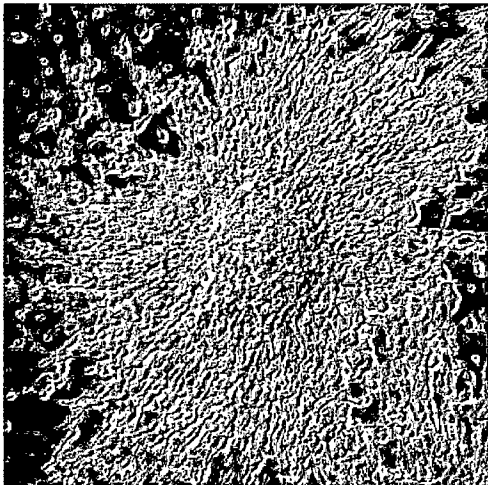
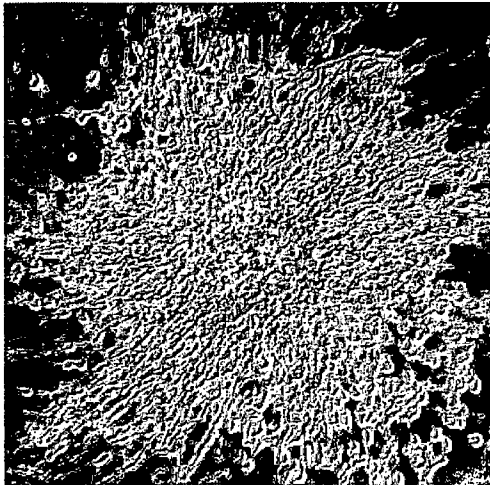


図 2 4

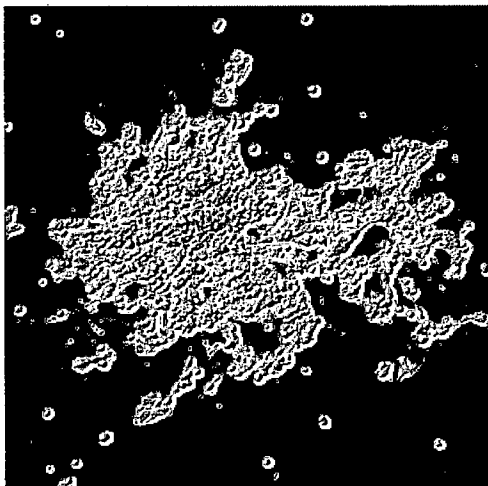
control



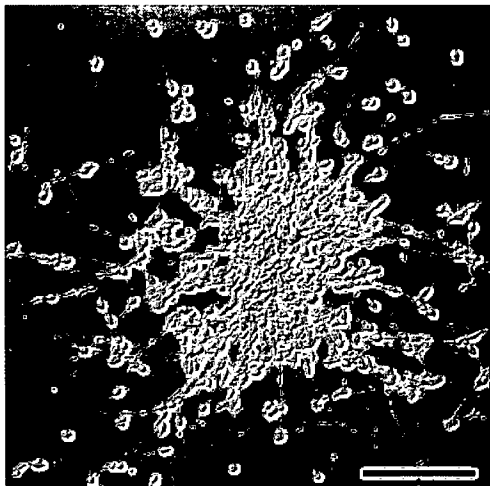
SNJ1945
(200 μ M)



ALLN
(50 μ M)



E64d
(100 μ M)



100 μ m

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078000

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61K9/08(2006.01)i, A61K31/27(2006.01)i, A61K31/341
(2006.01)i, A61K31/351(2006.01)i, A61K31/44(2006.01)i, A61P25/00
(2006.01)i, C07K5/023(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K38/00, A61K9/08, A61K31/27, A61K31/341, A61K31/351, A61K31/44,
A61P25/00, C07K5/023

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2006-076989 A (Senju Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 March 2006 (23.03.2006), entire text; particularly, examples, paragraph [0025] & WO 2005/056519 A1 & EP 1692098 A1 & US 2007/0004643 A1	1-9, 12-15
Y	Yamada M. et al., Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly., Nature Medicine, 2009, Vol.15, No.10, pages 1202 to 1207, ISSN:1078-8956	1-9, 12-15

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
20 December, 2011 (20.12.11)

Date of mailing of the international search report
27 December, 2011 (27.12.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078000

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Wynshaw-Boris A. et al., Lissencephaly: mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies., Seminars in Cell & Developmental Biology, 2010.10, Vol.21, No.8, pages 823 to 830, ISSN:1084-9521	1-9,12-15
Y	Takitoh T. et al., Inhibition of calpain increases LIS1 and partially rescues in vivo phenotypes in LIS1 mutant mice: a potential therapy for lissencephaly., Journal of Japanese Biochemical Society, 2008, Abstract CD, page 3P-0426, ISSN:0037-1017	1-9,12-15
Y	Hirotsune S. et al., Inhibition of calpain increases LIS1 and partially rescues in vivo phenotypes in Lis1 mutant mice: a potential therapy for lissencephaly., Journal of Japanese Biochemical Society, 2009, Abstract CD, page 2S2a-3, ISSN:0037-1017	1-9,12-15
Y	Yamada M. et al., Inhibition of calpain increases LIS1 (PAFAH1B1) and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly., Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Koen Yoshishu, 2009, vol.32nd, no.Vol.2, page 141, 2P-0404	1-9,12-15
Y	Shinji HIROTSUNE, "Bunshi Kiko Kaimei o Toshite no Katsunosho no Aratana Chiryoho no Kaihatsu", Boshi Kenko Kyokai Shoni Igaku Josei Kenkyu Hokokusho, 2010.06, vol.21st, pages 19 to 22	1-9,12-15
Y	Hiroyuki SORIMACHI, "Tanpakushitsu Bunkai no Seiri to Byotai Calpain no Kino Fuzen to Shikkan", Medical Science Digest, 2010.03, vol.36, no.3, pages 706 to 710, ISSN:1347-4340	1-9,12-15
Y	Shmueli O. et al., Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase activity, LIS1 expression, and seizures., Journal of Neuroscience Research, 1999, Vol.57, No.2, pages 176 to 184, ISSN: 0360-4012	1-9,12-15
Y	Morris S.M. et al., The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC., Current Biology, 1998, Vol.8, No.10, pages 603 to 606, ISSN:0960-9822	1-9,12-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078000

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Reiner O. et al., Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration., Journal of Neuroscience, 1995, Vol.15, No.5, pages 3730 to 3738, ISSN: 0270-6474	1-9, 12-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/078000

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10, 11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10 and 11 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61K9/08(2006.01)i, A61K31/27(2006.01)i, A61K31/341(2006.01)i,
A61K31/351(2006.01)i, A61K31/44(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, C07K5/023(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A61K38/00, A61K9/08, A61K31/27, A61K31/341, A61K31/351, A61K31/44, A61P25/00, C07K5/023

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-076989 A (千寿製薬株式会社) 2006.03.23, 文献全体、特に、実施例、【0025】 & WO 2005/056519 A1 & EP 1692098 A1 & US 2007/0004643 A1	1-9, 12-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 0 . 1 2 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 7 . 1 2 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小森 潔

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 5 2

4 C

3 7 6 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Yamada M. et al., Inhibition of calpain increases LIS1 expression and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly., Nature Medicine, 2009, Vol.15, No.10, pages 1202 to 1207, ISSN:1078-8956	1-9, 12-15
Y	Wynshaw-Boris A. et al., Lissencephaly: mechanistic insights from animal models and potential therapeutic strategies., Seminars in Cell & Developmental Biology, 2010.10, Vol.21, No.8, pages 823 to 830, ISSN:1084-9521	1-9, 12-15
Y	Takitoh T. et al., Inhibition of calpain increases LIS1 and partially rescues in vivo phenotypes in LIS1 mutant mice: a potential therapy for lissencephaly., 生化学, 2008, 抄録 CD, page 3P-0426, ISSN:0037-1017	1-9, 12-15
Y	Hirotsune S. et al., Inhibition of calpain increases LIS1 and partially rescues in vivo phenotypes in Lis1 mutant mice: a potential therapy for lissencephaly., 生化学, 2009, 抄録 CD, page 2S2a-3, ISSN:0037-1017	1-9, 12-15
Y	Yamada M. et al., Inhibition of calpain increases LIS1 (PAFAH1B1) and partially rescues in vivo phenotypes in a mouse model of lissencephaly., 日本分子生物学会年会講演要旨集, 2009, Vol.32nd, No.Vol.2, page 141, 2P-0404	1-9, 12-15
Y	広常真治, 分子機構解明を通しての滑脳症の新たな治療法の開発, 母子健康協会小児医学助成研究報告書, 2010.06, Vol.21st, pages 19 to 22	1-9, 12-15
Y	反町洋之, 蛋白質分解の生理と病態 カルパインの機能不全と疾患, Medical Science Digest, 2010.03, Vol.36, No.3, pages 706 to 710, ISSN:1347-4340	1-9, 12-15

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	Shmueli O. et al., Platelet-activating factor (PAF) acetylhydrolase activity, LIS1 expression, and seizures., Journal of Neuroscience Research, 1999, Vol.57, No.2, pages 176 to 184, ISSN:0360-4012	1-9, 12-15
Y	Morris S.M. et al., The lissencephaly gene product Lis1, a protein involved in neuronal migration, interacts with a nuclear movement protein, NudC., Current Biology, 1998, Vol.8, No.10, pages 603 to 606, ISSN:0960-9822	1-9, 12-15
Y	Reiner O. et al., Lissencephaly gene (LIS1) expression in the CNS suggests a role in neuronal migration., Journal of Neuroscience, 1995, Vol.15, No.5, pages 3730 to 3738, ISSN:0270-6474	1-9, 12-15

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 1 0 , 1 1 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 1 0 , 1 1 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。