

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3830976号

(P3830976)

(45) 発行日 平成18年10月11日(2006.10.11)

(24) 登録日 平成18年7月21日(2006.7.21)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	Z N A E
A 6 1 K 38/55 (2006.01)	A 6 1 K 37/64	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
請求項の数 15 (全 74 頁) 最終頁に続く		

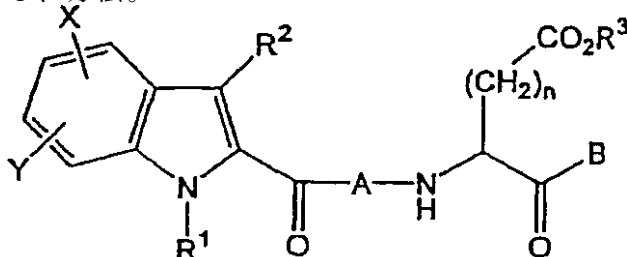
(21) 出願番号	特願平10-513040	(73) 特許権者	アイドゥン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド
(86) (22) 出願日	平成9年9月12日(1997.9.12)		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 92 037, ラ ホヤ, エヌ. トレイパインズ ロード 11085, ストート 300
(65) 公表番号	特表2001-500377 (P2001-500377A)	(74) 代理人	弁理士 清水 初志
(43) 公表日	平成13年1月16日(2001.1.16)		
(86) 国際出願番号	PCT/US1997/016369	(74) 代理人	弁理士 新見 浩一
(87) 国際公開番号	W01998/010778	(72) 発明者	フリッツ, ローレンス シー, アメリカ合衆国 カリフォルニア 920 67, ランチョ サンタフェ, ビー. オー . ボックス 676150
(87) 国際公開日	平成10年3月19日(1998.3.19)		
審査請求日	平成14年3月14日(2002.3.14)		
(31) 優先権主張番号	60/26,011		
(32) 優先日	平成8年9月12日(1996.9.12)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	08/710,621		
(32) 優先日	平成8年9月20日(1996.9.20)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-1 β -転換酵素 (ICE) / CED-3ファミリーインヒビターを用いたアポトーシスの阻害

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

エキスピボ又はインビトロで細胞集団の生存を拡大または増大させる方法であって、該方法は、該細胞を、インターロイキン-1 β -転換酵素(ICE)/CED-3ファミリーの少なくとも1個のメンバーのプロテアーゼ活性を抑制する試薬の阻害有効量と接触させて、該細胞集団のアポトーシスを阻害し、それにより、該細胞集団の生存を拡大または増大させることを包含し、該試薬は式1又は式3の化合物若しくはそれらの薬学的に受容可能な塩である、方法。



式1

ここで：

nは、1または2である；

R¹は、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、(置換)フ

フェニル、フェニルアルキル、（置換）フェニルアルキル、ヘテロアリール、（ヘテロアリール）アルキルまたは $(\text{CH}_2)_m \text{CO}_2 \text{R}^4$ であり、ここで、 $m = 1 \sim 4$ であり、そして R^4 は、以下で定義する。

R^2 は、水素原子、クロロ、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニル、（置換）フェニル、フェニルアルキル、（置換）フェニルアルキル、ヘテロアリール、（ヘテロアリール）アルキルまたは $(\text{CH}_2)_p \text{CO}_2 \text{R}^5$ であり、ここで、 $p = 0 \sim 4$ であり、そして R^5 は、以下で定義する；

R^3 は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニルアルキルまたは（置換）フェニルアルキルである；

R^4 は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニルアルキルまたは（置換）フェニルアルキルである；

R^5 は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニルアルキルまたは（置換）フェニルアルキルである；

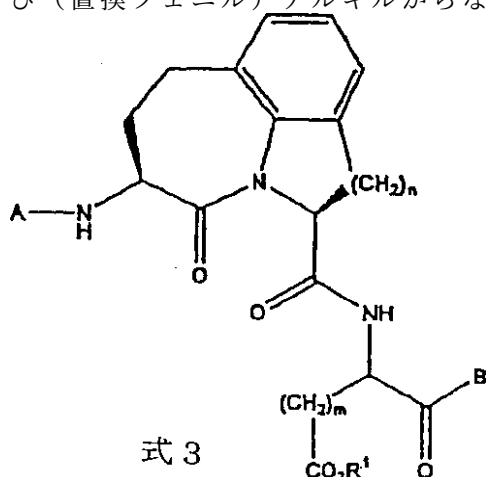
A は、天然または非天然のアミノ酸である；

B は、水素原子、重水素原子、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニル、（置換）フェニル、フェニルアルキル、（置換）フェニルアルキル、ヘテロアリール、（ヘテロアリール）アルキル、ハロメチル、 $\text{CH}_2 \text{ZR}^6$ 、 $\text{CH}_2 \text{OCO}$ （アリール）、 $\text{CH}_2 \text{OCO}$ （ヘテロアリール）、または $\text{CH}_2 \text{OP}(\text{O})(\text{R}^7) \text{R}^8$ であり、ここで、Z は、酸素原子またはイオウ原子である；

R^6 は、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキル、置換フェニルアルキル、ヘテロアリールまたは（ヘテロアリール）アルキルである；そして

R^7 はおよび R^8 は、独立して、アルキル、シクロアルキル、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキル、（置換フェニル）アルキルおよび（シクロアルキル）アルキルからなる群から選択される；そして

X および Y は、独立して、水素原子、ハロ、トリハロメチル、アミノ、保護アミノ、アミノ塩、一置換アミノ、二置換アミノ、カルボキシ、保護カルボキシ、カルボン酸塩、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、ヒドロキシ基の塩、低級アルコキシ、低級アルキルチオ、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、置換（シクロアルキル）アルキル、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキルおよび（置換フェニル）アルキルからなる群から選択される。



ここで：

n は、1 または 2 である；

m は、1 または 2 である；

A は、 $\text{R}^2 \text{CO}-$ 、 $\text{R}^3-\text{O}-\text{CO}-$ または $\text{R}^4 \text{SO}_2-$ ；

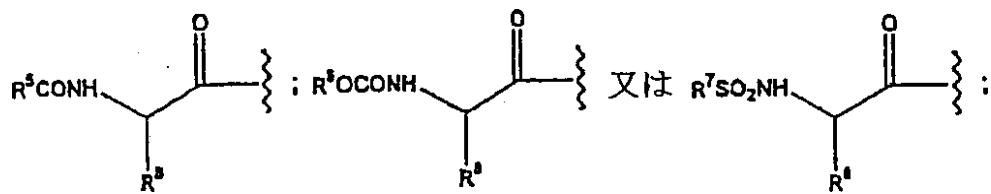
次式の基：

10

20

30

40



さらに、ここで：

R^1 は、水素原子、アルキルまたはフェニルアルキルである；

R^2 は、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、（置換フェニル）アルキル、ヘテロアリールまたは（ヘテロアリール）アルキルである；

R^3 は、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニルアルキルまたは（置換フェニル）アルキルである；

R^4 は、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、（置換フェニル）アルキル、ヘテロアリールまたは（ヘテロアリール）アルキルである；

R^5 は、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、（置換フェニル）アルキル、ヘテロアリールまたは（ヘテロアリール）アルキルである；

R^6 は、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニルアルキルまたは（置換フェニル）アルキルである；

R^7 は、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、（置換フェニル）アルキル、ヘテロアリールまたは（ヘテロアリール）アルキルである；

R^8 は、天然および非天然アミノ酸からなる群から選択されるアミノ酸側鎖である；

B は、水素原子、重水素原子、アルキル、シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、（置換フェニル）アルキル、ヘテロアリール、（ヘテロアリール）アルキルまたはハロメチル；

次式の基：

$-\text{CH}_2\text{XR}^9$ ；

ここで、 R^9 は、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキル、（置換フェニル）アルキル、ヘテロアリールまたは（ヘテロアリール）アルキルである；そして X は、酸素原子またはイオウ原子である；

次式の基：

$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ （アリール）；

次式の基：

$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ （ヘテロアリール）；

次式の基：

$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}(\text{R}^{10})\text{R}^{11}$ ；

ここで、 R^{10} および R^{11} は、独立して、アルキル、シクロアルキル、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキルおよび（置換フェニル）アルキルからなる群から選択される。

【請求項 2】

前記細胞が、分化細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞が、前駆細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記細胞が、顆粒球、単核細胞、赤血球、リンパ球および血小板からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記接触が、エキスピボで行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

前記試薬が、不可逆的にプロテアーゼ活性を抑制する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記試薬が、可逆的にプロテアーゼ活性を抑制する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

さらに、前記細胞を、成長因子と接触させることを包含する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

エキスピボ又はインビトロでの器官の生存能を延長する方法であって、該方法は、器官の細胞を、インターロイキン-1 β -転換酵素 (ICE)/CED-3ファミリーの少なくとも 1 個のメンバーのプロテアーゼ活性を抑制する試薬の阻害有効量と接触させて、それにより、未処理の器官と比較して、この器官の生存能を延長することを包含し、該試薬は前記式 1 又は式 3 の化合物若しくはそれらの薬学的に受容可能な塩である、方法。

10

【請求項 10】

前記器官が、エキスピボで接触する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記試薬が、不可逆的にプロテアーゼ活性を抑制する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 12】

前記試薬が、可逆的にプロテアーゼ活性を抑制する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 13】

インビトロでの生物生産を増大させる方法であって、該方法は、目的の生成物を産生する宿主細胞 (host cell) を、ICE/CED-3ファミリーの少なくとも 1 個のメンバーのプロテアーゼ活性を抑制する試薬と接触させて、それにより、インビトロでの該細胞の生存を増大することを包含し、該試薬は前記式 1 又は式 3 の化合物若しくはそれらの薬学的に受容可能な塩である、方法。

20

【請求項 14】

前記試薬が、不可逆的にプロテアーゼ活性を抑制する、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記試薬が、可逆的にプロテアーゼ活性を抑制する、請求項 13 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は、一般に、プログラムされた細胞死に関し、具体的には、インターロイキン-1 β -転換酵素 (ICE)/CED-3ファミリーインヒビターを用いて、移植用器官の生存能を延長し、生物生産 (bioproduction) で使用される細胞株の生存能を維持するための、造血細胞の増大方法に関する。

30

発明の背景

本発明は、一般に、プログラムされた細胞死に関し、具体的には、インターロイキン-1 β -転換酵素 (ICE)/CED-3ファミリーインヒビターを用いて、移植用器官の生存能を延長し、生物生産で使用する細胞株の生存能を維持するための、造血細胞の増大方法に関する。アポトーシスおよびネクローシスは、細胞が死滅し得る 2 つの基本的なプロセスである。ネクローシスでは、細胞死は、通常、細胞損傷の結果である。その細胞は、一般に、膨潤および溶解し、細胞内容物は、細胞外空間にあふれる。対照的に、アポトーシスは、単一細胞が生体組織の中で消去される形態の細胞死である。アポトーシスは、再構築された組織でのプログラムされた細胞死の殆どの原因であり、エンドクリンおよび他の成長刺激剤の使用中止に続く成体組織の萎縮に付随する細胞損失の原因である。加えて、アポトーシスは、正常組織のターンオーバー (すなわち、細胞ホメオスタシス) の過程での細胞の生理学的な死の原因である (Kerr, J. F. ら、1972. Br. J. Cancer 26: 239-257; Wyllie, A. H. ら、1980. Int. Rev. Cytol. 68: 251-306) と考えられている。

40

アポトーシスの作動メカニズムは、完全には理解されていないが、最終的に、ある種の核変化が起こり、それは、内因性ヌクレアーゼの活性化により起こり、ヌクレオソーム間のクロマチンを切断し、そしてアポトーシス細胞中のインタクト DNA の含量を低減すると思われる。多数のアポトーシス調節剤が同定されている。それらの一部は、プロトオンコジ

50

ーンおよびオンコサプレッサー遺伝子(c-myc、bcl-2、p53およびrasを含めて)として、既に知られている。このプロトオンコジーン産物およびオンコサプレッサータンパク質は、アポトーシスに対する細胞感受性を制御すると考えられている(Issacs, J. T. 1994. *Curr. Opin. Oncol.* 6: 82-89)。C-mycは、重要な成長因子の有効性に依存して、細胞が引き続いて増殖するかまたはアポトーシスに入るかどうかを決定し得る(Bissonete, R. P.ら、1994. In *Apoptosis II: The Molecular Basis of Apoptosis in Diseases*. Cold Spring Harbor Laboratory Press)。培養細胞では、増殖は、通常、c-mycおよび成長因子の存在下にて認められるのに対して、アポトーシスは、c-mycは存在するが成長因子は存在しないときに、見られる。ある種の他のオンコジーン(例えば、bcl-2)は、アポトーシスに対する感受性から細胞を解放する。具体的には、bcl-2遺伝子ファミリーのメンバーは、プログラムされた細胞死を抑制するか(例えば、bcl-2、bcl-xL、ced-9)または細胞死を促進する(例えば、bax、bak、bcl-xS)ように作用し得る。加えて、このICE/CED-3ファミリーのメンバーは、細胞死を促進し得る(例えば、ICE、CPP32、Ich-1、CED3)。

インターロイキン1(「IL-1」)は、主要なプロ炎症性(pro-inflammatory)および免疫調節性タンパク質であり、これは、繊維芽細胞の分化および増殖、滑膜細胞および軟骨細胞によるプロスタグランジン、コラゲナーゼおよびホスホリパーゼの産生、好塩基球および好酸球の脱顆粒ならびに好中球活性化を刺激する(Oppenheim, J.H.ら、*Immunology Today*, 7: 45-56(1986))。IL-1は、炎症応答の一部として、末梢血単核細胞により、優先的に産生される(Mosely, B.S.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84: 4572-4576(1987); Lonnemann, G.ら、*Eur. J. Immunol.*, 19: 1531-1536 (1989))

哺乳類のIL-1 β は、約31.5kDaの前駆体ポリペプチドとして、合成される(Limjucoら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 3972, 1986)。前駆体IL-1 β は、IL-1レセプターに結合できず、生体不活性である(Mosleyら、*J. Biol. Chem.*, 262: 2941, 1987)。生体活性は、タンパク質分解プロセッシングに依存して現れ、その結果、前駆体31.5kDa形状が17.5kDa IL-1 β 形状に転換される。

ヒト前駆体IL-1 β が成熟するタンパク質分解成熟では、17kDaのIL-1 β は、Asp¹¹⁶およびAla¹¹⁷の切断から得られる。エンドプロテイナーゼ(インターロイキン-1 β 転化酵素(ICE)と呼ばれる)は、Asp¹¹⁶-Ala¹¹⁷だけでなく、Asp²⁷-Gly²⁸部位にて、IL-1 β 前駆体を切断し得、そしてAla¹¹⁷にて、適当なアミノ酸末端で、成熟IL-1 β を産生し得るヒト単核細胞である。位置116のAspは、切断に必須であることが分かっている。Ala(Kosturaら、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 5227, 1989)または他のアミノ酸(Howardら、*J. Immunol.*, 147: 2964, 1991)をAspと置き換えると、この切断事象を阻害するからである。

ヒトICEの基質特異性は、この酵素の切断部位を広げるペプチドの使用により、規定されている。ペプチド基質の2つの特徴は、その酵素による触媒認識にとって必須である。第1に、切断部位に隣接したアスパラギン酸は、このIL-1 β 前駆体およびペプチド基質中のこの残基の任意の置換により、触媒作用の速度が相当減少するという点で、非常に好ましい(Kosturaら、*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 5227, 1989; Sleathら、*J. Biol. Chem.*, 265: 14526, 1990; Howardら、*J. Immunol.*, 147: 2964, 1991)。この切断部位の左の4個のアミノ酸に対しては、同等に、厳しい必要条件が存在するのに対して、その右には、メチレンアミンで充分である。この酵素に対する最小基質(AC-Tyr-Val-Ala-Asp-NH-CH₃)は、IL-1 β 前駆体それ自体のものと類似の相対V_{max}/K_mを有する特に良好なペプチド基質である(Thornberryら、*Nature* 356: 768, 1992)。

ICEは、以下の規準により、システインプロテアーゼである：(1)ジアゾメチルケトン、AC-Tyr-Val-Ala-Asp-COCHNH₂は、この酵素の強力な競合性で不可逆的なインヒビターである；(2)ヨードアセテートによるこの酵素の不活性化は、基質と競合的である；および(3)触媒活性Cysは、他のシステインまたはジチオスレイトールよりも10倍より速く、[¹⁴C]ヨードアセテートと選択的に反応する(Thornberryら、*Nature* 356: 768, 1992)。

ICEは、線虫*C. elegans*での細胞死エフェクターとして機能するCED-3プロテアーゼと、構造的かつ機能的に関連している(Yuanら、*Cell*, 75: 641, 1993)。ICEおよびCED-3は、より大きなプロテアーゼファミリー(ICE/CED-3ファミリー)(これには、CPP32、ICH-1、Mch-

10

20

30

40

50

2、ICE_{rel} II、ICE_{rel} III、Mch-3、Mch-4およびMch-5が挙げられる)の一部をなす。これらの酵素の全ては、その活性部位において、著しい相同性を共有するシステインプロテアーゼである。これらはまた、asp-x結合での基質切断に関する特異性を共有する。加えて、ICE-CED-3ファミリーのメンバーのそれぞれは、プロ酵素として合成され、これは、次いで、タンパク質分解的に活性化されて、活性酵素を形成する。

それゆえ、システインプロテアーゼのICE/CED-3ファミリーのインヒビターが治療剤として有用な疾患状態には、以下が挙げられる：感染性疾患(例えば、髄膜炎および耳管炎)；敗血性ショック、呼吸器疾患；炎症性病態(例えば、関節炎、胆管炎、結腸炎、脳炎、子宮膜炎、肝炎、膵炎および再灌流傷害)；虚血性疾患(例えば、心筋梗塞、脳卒中および虚血性腎臓疾患)；免疫ベースの疾患(例えば、過敏性)；自己免疫疾患(例えば、多発性硬化症)；骨疾患；およびある種の神経退行性疾患。

種々の細胞培養系では、ICE/CED-3ファミリーのメンバーを阻害すれば、アポトーシスを効果的に阻害し得ることが明らかとなった。例えば、アセチル-DEVD-アルデヒド化合物は、T-リンパ球細胞株にて、抗Fas誘発のアポトーシスを抑制した(Schlegelら、J. Biol. Chem. 271: 1841、1996；Enariら、Nature、380: 723、1996)。同様に、アセチル-YVAD-アルデヒドおよびアセチル-YVAD-クロロメチルケトン、インビトロおよびインビボにて、運動ニューロンの死をブロックした(Milliganら、Neuron、15: 385、1995)。加えて、ICE/CED-3ファミリーインヒビターであるBoc-D-(ベンジル)クロロメチルケトンおよびcrmAは、細胞外マトリックスがないときに起こる哺乳類の上皮細胞の細胞死を防止した(Boudreauら、Science、267: 891、1995)。

アポトーシスの制御は、疾患治療に有用性があり得ることが知られている。具体的には、ICE/CED-3ファミリーのインヒビターは、治療効果を有し得る。例えば、ICEの抑制は、炎症疾患の治療に有用であり得ることが提案されている(Dollら、J. Med. Chem. 37: 563、1994；Thornberryら、Biochemistry、33: 3934、1994)。ICE/CED-3ファミリーメンバーのインヒビターは、退行性疾患、例えば、神経退行性疾患(例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化、ハンチントン舞踏病)、心臓または中枢神経系の虚血性疾患(例えば、心筋梗塞および脳卒中)、および外傷性脳障害だけでなく、脱毛、エイズおよび毒物誘発性肝臓疾患を治療する際に、有用性を有し得ることも、知られている(Nicholson、Nature Biotechnology 14: 297、1996)。

ICEのペプチドおよびペプチジルインヒビターが記述されている。しかしながら、このようなインヒビターは、典型的には、望ましくない薬理学特性(例えば、乏しい経口吸収性、乏しい安定性および迅速な代謝)により、特徴づけられる(Plattner、J.J.およびD.W. Norbeckは、Drug Discovery Technologies、C.R. ClarkおよびW.H. Moos著(Ellis Horwood、Chichester、England、1990)、pp. 92-126)。これらの望ましくない特性は、効果的な薬剤の開発を妨害している。本発明の方法は、立体的に束縛されたジペプチド擬態物またはN-置換インドイルペプチド代替物のいずれかの使用を包含する。これらの擬態物は、そのペプチド対応物と比較して、改良された特性(例えば、改良された吸収性および代謝安定性)を示し、その結果、バイオアベイラビリティが高まる。

発明の要旨

本発明は、インターロイキン-1 β -転換酵素(ICE)/CED-3ファミリーのプロテアーゼの活性を阻害することにより、細胞のプログラムされた死を防止することに関する。本発明は、ICE/CED-3インヒビターを使用する新規な方法を提供する。本発明は、ICE/CED-3インヒビターを使用して、造血細胞の集団を拡大し、細胞(インビトロで、細胞形質移入に使用する顆粒球を含めて)の生存を高め、種々の器官の生存を高め、そしてインビトロでの細胞からの生物生産を高める方法を提供する。

第一の実施態様では、本発明は、造血細胞集団を拡大するかまたはその生存を高める方法を提供し、この方法は、この細胞を、ICE/CED-3ファミリーの少なくとも1個のメンバーの活性を抑制する効果的な量の試薬と接触させて、それにより、未成熟な前駆体および/または成熟細胞のプログラムされた細胞死を阻害し、そしてこの細胞集団の生存を拡大および/または高めることを包含する。本発明の方法で含有される細胞集団には、顆粒球、

単核細胞、赤血球、リンパ球および血小板が挙げられる。

他の実施態様では、本発明は、移植前および/または移植後に、器官の生存能を延長する方法を提供し、この方法は、器官の細胞を、1種またはそれ以上のICE/CED-3ファミリーメンバーの活性を抑制する阻害効果量の試薬と接触させて、それにより、未処理の器官と比較して、この器官の生存能を延長することを包含する。移植用の器官は、インビボ、エキスビボまたは両方で、このような試薬で治療され得る。この器官は、インタクトの器官、または器官に由来の分離細胞(例えば、分離したランゲルハンス島細胞、分離したドーパミン作動性ニューロン、血液または造血細胞)のいずれかであり得る。

さらに他の実施態様では、本発明は、インビボでの生物生産を高める方法を提供し、この方法は、生物生産宿主細胞(host cell)を、ICE/CED-3ファミリーの少なくとも1個のメンバーの活性を抑制する試薬と接触させて、それにより、インビボでのこのような細胞の生存を高めることを包含する。

10

ICE/CED-3インヒビターとして有用な例示の化合物もまた、本発明に含まれる。このような化合物および合成方法は、それらの全体が、同時係属中の米国特許出願第08/710,610号(9/20/96に出願された)および第08/767,175号(12/16/96に出願された)およびそれらの個々の一部継続出願に記述されている。

【図面の簡単な説明】

図1は、ICEおよびhCPP32酵素の活性を阻害する際の、式Aの化合物の活性を示す。

図2は、組み換えICE、hCPP32、MCH2およびMCH5酵素に関する、式Bの化合物の活性を例示する。

20

図3は、組み換えICE、CPP32、MCH2およびMCH5酵素に関する、式Cの化合物の活性を例示する。

図4は、ICE、CPP32、MCH2およびMCH5酵素の活性を阻害する際の、式Dの化合物の活性を示す。

図5は、ICE、CPP32、MCH2およびMCH5酵素の活性を阻害する際の、実施例106の活性を示す。

図6は、FACS分析から誘導された(dervied)結果を示し、これは、DNA含量(低二倍体%)により測定した好中球の生存に関する、ICE/CED-3インヒビターの効果を立証している。

図7は、生存好中球が酸化的破裂を起こす能力により測定されるICE/CED-3インヒビターの効果または好中球の生存を示す。

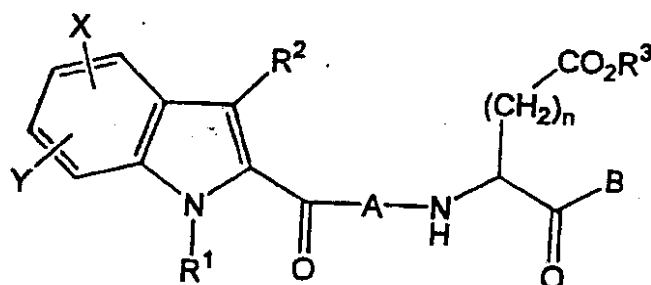
30

発明の詳細な説明

本発明は、ICE/CED-3ファミリーのメンバーの阻害により、プログラムされた細胞死またはアポトーシスを阻害する方法を提供する。これは、ICE/CED-3酵素活性のインヒビターだけでなく、ICE/CED-3ファミリーをコードする遺伝子の発現を特異的に防止する方法を包含する。それゆえ、ICE/CED-3ファミリーメンバー遺伝子と相補的なヌクレオチド配列から構成され、関連タンパク質の転写または翻訳を阻害し得るアンチセンスRNAまたはDNA、ICE/CED-3プロテアーゼ(例えば、その活性部位システインを、セリンまたはアラニンのような他のアミノ酸で置き換えるように設計された変異体)のドミナントネガティブな形態の発現、またはICE/CED-3ファミリーポリペプチドと結合する抗体は、ペプチドを含めた低分子インヒビターと同様に、本発明の範囲内である。

40

本発明の方法を記述する前に、本発明の方法で有用な化合物またはそれらの薬学的に受容可能な塩を、以下に記述する：



式 1

ここで：

n は、1または2である；

R^1 は、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、(置換)フェニル、フェニルアルキル、(置換)フェニルアルキル、ヘテロアリール、(ヘテロアリール)アルキルまたは $(CH_2)_m CO_2 R^4$ であり、ここで、 $m = 1 \sim 4$ であり、そして R^4 は、以下で定義する；

R^2 は、水素原子、クロロ、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、(置換)フェニル、フェニルアルキル、(置換)フェニルアルキル、ヘテロアリール、(ヘテロアリール)アルキルまたは $(CH_2)_p CO_2 R^5$ であり、ここで、 $p = 0 \sim 4$ であり、そして R^5 は、以下で定義する；

R^3 は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニルアルキルまたは(置換)フェニルアルキルである；

R^4 は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニルアルキルまたは(置換)フェニルアルキルである；

R^5 は、水素原子、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニルアルキルまたは(置換)フェニルアルキルである；

Aは、天然または非天然のアミノ酸である；

Bは、水素原子、重水素原子、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、(置換)フェニル、フェニルアルキル、(置換)フェニルアルキル、ヘテロアリール、(ヘテロアリール)アルキル、ハロメチル、 $CH_2 ZR^6$ 、 $CH_2 OCO$ (アリール)、または $CH_2 OCO$ (ヘテロアリール)、または $CH_2 OPO(R^7)R^8$ であり、ここで、Zは、酸素原子またはイオウ原子である；

R^6 は、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキル、(置換フェニル)アルキル、ヘテロアリールまたは(ヘテロアリール)アルキルである；そして

R^7 および R^8 は、独立して、アルキル、シクロアルキル、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキル、(置換フェニル)アルキルおよび(シクロアルキル)アルキルからなる群から選択される；そして

XおよびYは、独立して、水素原子、ハロ、トリハロメチル、アミノ、保護アミノ、アミノ塩、一置換アミノ、二置換アミノ、カルボキシ、保護カルボキシ、カルボン酸塩、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、ヒドロキシ基の塩、低級アルコキシ、低級アルキルチオ、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、置換(シクロアルキル)アルキル、フェニル、(置換)フェニル、フェニルアルキルおよび(置換フェニル)アルキルからなる群から選択される。

上記の式1および下記の式3に使用されるように、用語「アルキル」は、置換または非置換の直鎖または分枝鎖の $C_1 \sim C_8$ 炭素鎖（例えば、メチル、エチル、tert-ブチル、イソプロピル、n-オクチルなど）を意味する。

用語「シクロアルキル」は、完全に飽和または部分的に不飽和の一環式、二環式、または三環式飽和環を意味する。そのような環の例はシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、アダマンチル、シクロオクチル、シスまたはトランスデカリン、ビスクロ[2.2.1]ヘプト-2-エン、シクロヘキシ-1-エニル、シクロペント-1-エニル、1,4-シクトオクタジエニルなどを含む。

10

20

30

40

50

用語「(シクロアルキル)アルキル」は、上記のシクロアルキル環の1つを置換された上記定義のアルキル基を意味する。そのような基の例は、(シクロヘキシル)メチル、3-(シクロプロピル)-n-プロピル、5-(シクロペンチル)ヘキシル、6-(アダマンチル)ヘキシルなどを含む。

用語「置換フェニル」は、以下からなる群から選択される部分の1つ以上、好ましくは1つまたは2つで置換されたフェニル基を特定する：ハロゲン、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、シアノ、ニトロ、トリフルオロメチル、 $C_1 \sim C_7$ アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アルコキシ、 $C_1 \sim C_7$ アシル、 $C_1 \sim C_7$ アシロキシ、カルボキシ、保護カルボキシ、カルボキシメチル、保護カルボキシメチル、ヒドロキシメチル、保護ヒドロキシメチル、アミノ、保護アミノ、(モノ置換)アミノ、保護(モノ置換)アミノ、(ジ置換)アミノ、カルボキサミド、保護カルボキサミド、N-($C_1 \sim C_6$ アルキル)カルボキサミド、保護N-($C_1 \sim C_6$ アルキル)カルボキサミド、N,N-ジ($C_1 \sim C_6$ アルキル)カルボキサミド、トリフルオロメチル、N-($C_1 \sim C_6$ アルキル)スルホニル)アミノ、N-(フェニルスルホニル)アミノ、あるいは置換または非置換フェニル(例えば、後者の場合ビフェニル基もしくはナフチル基を生じる)。

用語「置換フェニル」の例は、2、3、または4-クロロフェニル、2,6-ジクロロフェニル、2,5-ジクロロフェニル、3,4-ジクロロフェニル、2、3または4-ブロモフェニル、3,4-ジブロモフェニル、3-クロロ-4-フルオロフェニル、2、3または4-フルオロフェニルなどのようなモノまたはジ(ハロ)フェニル基；2、3または4-ヒドロキシフェニル、2,4-ジヒドロキシフェニル、これらの保護ヒドロキシ誘導体などのようなモノまたはジ(ヒドロキシ)フェニル基；2、3または4-ニトロフェニルなどのようなニトロフェニル基；2、3、または4-シアノフェニルなどのようなシアノフェニル基；2、3、または4-メチルフェニル、2、4-ジメチルフェニル、2、3または4-(イソ-プロピル)フェニル、2、3または4-エチルフェニル、2、3または4-(n-プロピル)フェニルなどのようなモノまたはジ(アルキル)フェニル基；2,6-ジメトキシフェニル、2、3または4-(イソ-プロポキシ)フェニル、2、3または4-(t-ブトキシ)フェニル、3-エトキシ-4-メトキシフェニルなどのモノまたはジ(アルコキシ)フェニル基；2、3または4-トリフルオロメチルフェニル；2、3または4-カルボキシフェニルあるいは2,4-ジ(保護カルボキシ)フェニルなどのようなモノまたはジカルボキシフェニルあるいは(保護カルボキシ)フェニル基；2、3または4-(保護ヒドロキシメチル)フェニルまたは3,4-ジ(ヒドロキシメチル)フェニルなどのようなモノまたはジ(ヒドロメチル)フェニルあるいは(保護ヒドロキシメチル)フェニル；2、3または4-(アミノメチル)フェニルあるいは2,4-(保護アミノメチル)フェニルなどのようなモノまたはジ(アミノメチル)フェニルあるいは(保護アミノメチル)フェニル；あるいは2、3または4-(N-(メチルスルホニルアミノ))フェニルなどのようなモノまたはジ(N-(メチルスルホニルアミノ))フェニルを含む。また、用語「置換フェニル」は、置換基が異なるジ置換フェニル基を表し、例えば、3-メチル-4-ヒドロキシフェニル、3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル、2-メトキシ-4-ブロモフェニル、4-エチル-2-ヒドロキシフェニル、3-ヒドロキシ-4-ニトロフェニル、2-ヒドロキシ-4-クロロフェニルなどがある。

用語「(置換フェニル)アルキル」は、上記アルキル基の1つに結合した上記置換フェニル基の1つを意味する。このような基の例には、2-フェニル-1-クロロエチル、2-(4'-メトキシフェニル)エチル、4-(2',6'-ジヒドロキシフェニル)n-ヘキシル、2-(5'-シアノ-3'-メトキシフェニル)n-ペンチル、3-(2',6'-ジメチルフェニル)n-プロピル、4-クロロ-3-アミノベンジル、6-(4'-メトキシフェニル)-3-カルボキシ(n-ヘキシル)、5-(4'-アミノメチルフェニル)-3-(アミノメチル)n-ペンチル、5-フェニル-3-オキソ-n-ペント-1-イル、(4-ヒドロキシナフト-2-イル)メチルなどがある。

用語「ハロ」および「ハロゲン」は、フルオロ、クロロ、ブロモ、またはヨード基を意味する。これらは、同じまたは異なる1つ以上のハロゲンであり得る。好ましいハロゲンは、クロロおよびフルオロである。

10

20

30

40

50

用語「アリール」は、5および6員環の芳香族炭素環式環を意味する。6員環が好ましい。

用語「ヘテロアリール」は、酸素、イオウおよび/または窒素原子、特に窒素（単独またはイオウもしくは酸素環原子のいずれかと共に）のような1～4個のヘテロ原子を有する、必要に応じて置換された5員または6員環を表す。これらの5員または6員環は完全不飽和である。

以下の環系は、用語「ヘテロアリール」によって表されるヘテロ環式（置換または非置換のいずれか）基の例である：チエニル、フリル、ピロリル、ピロリジニル、イミダゾリル、イソキサゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリル、テトラゾリル、チアトリアゾリル、オキサトリアゾリル、ピリジル、ピリミジル、ピラジニル、ピリダジニル、オキサジニル、トリアジニル、チアジアジニルテトラゾロ、1,5-[b]ピリダジニルおよびプリニル、ならびにベンゾ縮合誘導体、例えば、ベンズオキサゾリル、ベンズチアゾリル、ベンズイミダゾリルおよびインドリル。

上記の必要に応じて置換されたヘテロアリール環の置換基は、1～3の、ハロ、トリハロメチル、アミノ、保護アミノ、アミノ塩、モノ置換アミノ、ジ置換アミノ、カルボキシ、保護カルボキシ、カルボン酸塩、ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、ヒドロキシ基の塩、低級アルコキシ、低級アルキルチオ、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、置換シクロアルキル、（シクロアルキル）アルキル、置換（シクロアルキル）アルキル、フェニル、置換フェニル、フェニルアルキル、および（置換フェニル）アルキル基がある。ヘテロアリール基の置換基は、上記で定義されたものと同様であるか、または以下に説明する。ヘテロアリール環の上記置換基と共に使用されるように、「トリハロメチル」は、トリフルオロメチル、トリクロロメチル、トリブロモメチル、またはトリヨードメチルであり得る。「低級アルコキシ」は、 $C_1 \sim C_4$ アルコキシ基を意味し、同様に、「低級アルキルチオ」は $C_1 \sim C_4$ アルキルチオ基を意味する。用語「置換アルキル」は、以下の基で1～3回置換された上記定義のアルキル基を意味する：ヒドロキシ、保護ヒドロキシ、アミノ、保護アミノ、シアノ、ハロ、トリフルオロメチル、モノ置換アミノ、ジ置換アミノ、低級アルコキシ、低級アルキルチオ、カルボキシ、保護カルボキシ、またはカルボキシ、アミノ、および/またはヒドロキシ塩。ヘテロアリール環の置換基と共に使用されるように、用語「置換（シクロアルキル）アルキル」および「置換シクロアルキル」は、「置換アルキル」基について列挙された基と同じ基で置換された上記で定義されたものである。用語「（モノ置換）アミノ」は、以下からなる群から選択される1つの置換基を有するアミノ基を意味する：フェニル、置換フェニル、アルキル、置換アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アシル、 $C_2 \sim C_7$ アルケニル、 $C_2 \sim C_7$ 置換アルケニル、 $C_2 \sim C_7$ アルキニル、 $C_7 \sim C_{16}$ アルキルアリール、 $C_7 \sim C_{16}$ 置換アルキルアリールおよびヘテロアリール基。（モノ置換）アミノは、さらに、用語「保護（モノ置換）アミノ」によって包含されるようなアミノ保護基を有し得る。用語「（ジ置換）アミノ」は、以下からなる群から選択される2つの置換基を有するアミノ基を意味する：フェニル、置換フェニル、アルキル、置換アルキル、 $C_1 \sim C_7$ アシル、 $C_2 \sim C_7$ アルケニル、 $C_2 \sim C_7$ アルキニル、 $C_7 \sim C_{16}$ アルキルアリール基、 $C_7 \sim C_{16}$ 置換アルキルアリールおよびヘテロアリール基。2つの置換基は同じか、または異なり得る。用語「ヘテロアリール（アルキル）」は、任意の位置で上記で定義されたヘテロアリール基によって置換された、上記で定義されたアルキル基を表す。

さらに、上記の必要に応じて置換された5員または6員の複素環は、必要に応じて、芳香族の5員または6員のアリールまたはヘテロアリール環系に縮合され得る。例えば、これらの環は、必要に応じて、芳香族の5員または6員環系（例えば、ピリジンまたはトリアゾール系）、好ましくは、ベンゼン環に縮合され得る。

用語「薬学的に受容可能な塩」は、カルボキシレートアニオンと塩を形成するものを含み、そして以下から選択されたような有機および無機カチオンと形成された塩を含む：アルカリおよびアルカリ土類金属（例えば、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、バリウムおよびカルシウム）；およびアンモニウムイオン；ならびに有機カチオン（例えば、ジベンジルアンモニウム、ベンジルアンモニウム、2-ヒドロキシエチルアンモニ

10

20

30

40

50

ウム、ビス(2-ヒドロキシエチル)アンモニウム、フェニルエチルベンジルアンモニウム、ジベンジルエチレンジアンモニウムなどのカチオン)。上記の用語に含まれる他のカチオンは、プロカイン、キニーネおよびN-メチルグルコサミンのプロトン化された形態、グリシン、オルニチン、ヒスチジン、フェニルグリシン、リジン、およびアルギニンのような塩基性アミノ酸のプロトン化された形態を含む。さらに、この用語は、カルボン酸およびアミノ基により形成された任意の双性イオン形態の本発明の化合物を意味する。カルボキシレートアニオンのために好ましいカチオンは、ナトリウムカチオンである。さらに、この用語は、塩基性基(例えば、アミノ基)との標準的な酸-塩基反応により形成される塩を含み、有機酸または無機酸を含む。このような酸は、塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、コハク酸、クエン酸、乳酸、マレイン酸、フマル酸、パルミチン酸、コール酸、パモ酸、粘液(mucic)酸、D-グルタミン酸、D-樟脳酸、グルタル酸、フタル酸、酒石酸、ラウリン酸、ステアリン酸、サリチル酸(salicylic)、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ソルビン酸、ピクリン酸、安息香酸、桂皮酸などの酸がある。

式1の化合物はまた、溶媒和物および水和物として存在し得る。従って、これらの化合物は、例えば、水和の水、またはこれらの溶媒和物の母液溶媒分子の1つ、または複数もしくはは任意の画分と結晶化し得る。そのような化合物の溶媒和物および水和物は、本発明の範囲に含まれる。

本明細書中に使用される用語「カルボキシ保護基」は、化合物上の他の官能基において反応が行われる間、カルボン酸基をブロックするまたは保護するために一般に使用される、カルボン酸基のエステル誘導体の1つを意味する。そのようなカルボン酸保護基の例は以下を含む: t-ブチル、4-ニトロベンジル、4-メトキシベンジル、3,4-ジメトキシベンジル、2,4-ジメトキシベンジル、2,4,6-トリメトキシベンジル、2,4,6-トリメチルベンジル、ペンタメチルベンジル、3,4-メチレンジオキシベンジル、ベンズヒドリル、4,4'-ジメトキシトリチル、4,4',4"-トリメトキシトリチル、2-フェニルプロピル、トリメチルシリル、t-ブチルジメチルシリル、フェナシル、2,2,2-トリクロロエチル、 β -(トリメチルシリル)エチル、 β -(ジ(n-ブチル)メチルシリル)エチル、p-トルエンスルホンエチル、4-ニトロベンジルスルホンエチル、アリル、シンナミル、1-(トリメチルシリルメチル)-プロベニルなどの部分。使用されるカルボキシ保護基の種は、誘導体化カルボン酸がその後の反応の条件に安定であり、そして適切な時点で、残りの分子を分裂させることなく除去され得る限り重要ではない。これらの基のさらなる例は以下に見出される: C.B. ReeseおよびE. Haslam, 「Protective Groups in Organic Chemistry」 J.G .W. McOmie編、Plenum Press, New York, NY, 1973,第5章、それぞれ、およびT.W. GreeneおよびP.G.M. Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」第2版、John Wiley and Sons, New York, NY, 1991,第5章、それぞれは本明細書中に参照として援用される。関連した用語は、「保護カルボキシ」であり、これは上記のカルボキシ保護基の1つで置換されたカルボキシ基を意味する。

用語「ヒドロキシ保護基」は、例えば、テトラヒドロピラニル、2-メトキシプロパ-2-イル、1-エトキシエト-1-イル、メトキシメチル、 β -メトキシエトキシメチル、メチルチオメチル、t-ブチル、t-アミル、トリチル、4-メトキシトリチル、4,4'-ジメトキシトリチル、4,4',4"-トリメトキシトリチル、ベンジル、アリル、トリメチルシリル、(t-ブチル)ジメチルシリル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル基などのヒドロキシ基に結合した、容易に切断され得る基を意味する。

ヒドロキシ保護基のさらなる例は、C.B. ReeseおよびE.Haslam, 「Protective Groups in Organic Chemistry」 J.G.W. McOmie編、Plenum Press, New York, NY, 1973,第3および4章、それぞれ、およびT.W. GreeneおよびP.G.M. Wuts, 「Protective Groups in Organic Synthesis」第2版、John Wiley and Sons, New York, NY, 1991,第2および3章に記載されている。好ましいヒドロキシ保護基は、tert-ブチル基である。関連した用語「保護ヒドロキシ」は、上記の1つのヒドロキシ保護基に結合したヒドロキシ基を意味する。本明細書中で使用される用語「アミノ保護基」は、分子の他の官能基を反応する間、アミノの官能性をブロックするまたは保護するために一般に使用されるアミノ基の置換基を意

10

20

30

40

50

味する。用語「保護（モノ置換）アミノ」は、モノ置換されたアミノの窒素原子上にアミノ保護基が存在することを意味する。

そのようなアミノ保護基の例は、以下を含む：ホルミル（「For」）基、トリチル基、フタルイミド基、トリクロロアセチル基、トリフルオロアセチル基、クロロアセチル基、ブロモアセチル基、およびヨードアセチル基、ウレタнтаイプ保護基、例えば、*t*-ブトキシカルボニル（「Boc」）、2-(4-ビフェニル)プロピル-2-オキシカルボニル（「Bpoc」）、2-フェニルプロピル-2-オキシカルボニル（「Poc」）、2-(4-キセニル)イソプロポキシカルボニル、1,1-ジフェニルエチル-1-オキシカルボニル、1,1-ジフェニルプロピル-1-オキシカルボニル、2-(3,5-ジメトキシフェニル)プロピル-2-オキシカルボニル（「Ddz」）、2-(*p*-トルイル)プロピル-2-オキシカルボニル、シクロペンタニルオキシカルボニル、1-メチルシクロペンタニルオキシカルボニル、シクロヘキサニルオキシカルボニル、1-メチルシクロヘキサニルオキシカルボニル、2-メチルシクロヘキサニルオキシカルボニル、2-(4-トルイルスルホニル)エトキシカルボニル、2-(メチルスルホニル)エトキシカルボニル、2-(トリフェニルホスフィノ)エトキシカルボニル、9-フルオレニルメトキシカルボニル（「Fmoc」）、2-(トリメチルシリル)エトキシカルボニル、アリルオキシカルボニル、1-(トリメチルシリルメチル)プロプ-1-エニルオキシカルボニル、5-ベンズイソキサリルメトキシカルボニル、4-アセトキシベンジルオキシカルボニル、2,2,2-トリクロロエトキシカルボニル、2-エチニル-2-プロポキシカルボニル、シクロプロピルメトキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、1-ピペリジルオキシカルボニル、ベンジルオキシカルボニル（「Cbz」）、4-フェニルベンジルオキシカルボニル、2-メチルベンジルオキシカルボニル、 α -2,4,5,-テトラメチルベンジルオキシカルボニル（「Tmz」）、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、4-フルオロベンジルオキシカルボニル、4-クロロベンジルオキシカルボニル、3-クロロベンジルオキシカルボニル、2-クロロベンジルオキシカルボニル、2,4-ジクロロベンジルオキシカルボニル、4-ブロモベンジルオキシカルボニル、3-ブロモベンジルオキシカルボニル、4-ニトロベンジルオキシカルボニル、4-シアノベンジルオキシカルボニル、4-(デシルオキシ)ベンジルオキシカルボニルなど；ベンゾイルメチルスルホニル基、2,2,5,7,8-ペンタメチルクロマン-6-スルホニル基（「PMC」）、ジチアスクシノイル（「Dts」）基、2-(ニトロ)フェニルスルフェニル基（「Nps」）、ジフェニルホスフィンオキシド基などのアミノ保護基。使用されるアミノ保護基の種は、誘導体化アミノ基がその後の反応の条件に安定であり、そして適切な時点で、残りの分子を分裂させることなく除去され得る限り重要ではない。好ましいアミノ保護基は、Boc、CbzおよびFmocである。上記用語に包含されるアミノ保護基のさらなる例は、有機合成およびペプチド分野において周知であり、そしてこれらは、以下に記載されている。例えば、T.W. GreeneおよびP.G.M. Wuts、「Protective Groups in Organic Synthesis」第2版、John Wiley and Sons, New York, NY, 1991,第7章、M. Bodanzsky、「Principles of Peptide Synthesis」、第1および第2改訂版、Springer-Verlag, New York, NY, 1984および1993、ならびにJ.M. StewartおよびJ.D. Young、「Solid Phase Peptide Synthesis」第2版、Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984、E. AthertonおよびR.C. Shephard、「Solid Phase Peptide Synthesis-A Practical Approach」IRL Press, Oxford, England (1989)、これらのそれぞれは本明細書中に参照として援用される。関連した用語「保護アミノ」は、上記のアミノ保護基で置換されたアミノ基を定義する。

用語「天然および非天然アミノ酸」（ α -アミノ酸）は、天然に生成するアミノ酸および天然に生成するペプチド（DおよびL型を含む）の合成アナログを調製する場合にペプチド化学分野の当業者によって一般に利用される他の「非タンパク新生」 α -アミノ酸の両方を意味する。天然に生成するアミノ酸は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、メチオニン、スレオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、システイン、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン酸、グルタミン、 γ -カルボキシグルタミン酸、アルギニン、オルニチン、およびリジンである。非天然 α -アミノ酸の例は、以下を含む：ヒドロキシリジン、シトルリン、キ

10

20

30

40

50

ヌレニン、(4-アミノフェニル)アラニン、3-(2'-ナフチル)アラニン、3-(1'-ナフチル)アラニン、メチオニンスルホン、(t-ブチル)アラニン、(t-ブチル)グリシン、4-ヒドロキシフェニルグリシン、アミノアラニン、フェニルグリシン、ビニルアラニン、プロパルギル-グリシン、1,2,4-トリアゾロ-3-アラニン、チロニン、6-ヒドロキシトリプトファン、5-ヒドロキシトリプトファン、3-ヒドロキシキヌレニン、3-アミノチロシン、トリフルオロメチル-アラニン、2-チエニルアラニン、(2-(4-ピリジル)エチル)システイン、3,4-ジメトキシフェニルアラニン、3-(2'-チアゾリル)アラニン、イボテン酸、1-アミノ-1-シクロペンタン-カルボン酸、1-アミノ-1-シクロヘキサン-カルボン酸、キスカル酸、3-(トリフルオロメチルフェニル)アラニン、(シクロヘキシル)グリシン、チオヒスチジン、3-メトキシチロシン、ノルロイシン、ノル

10

バリリン、アロイソロイシン、ホモアルギニン、チオプロリン、デヒドロプロリン、ヒドロキシプロリン、ホモプロリン、インドリン-2-カルボン酸、1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン-3-カルボン酸、1,2,3,4-テトラヒドロキノリン-2-カルボン酸、 α -アミノ-n-酪酸、シクロヘキシルアラニン、2-アミノ-3-フェニル酪酸、フェニル部分のオルト、メタ、またはパラ位が以下の1つまたは2つで置換されたフェニルアラニン： $(C_1 \sim C_4)$ アルキル、 $(C_1 \sim C_4)$ アルコキシ、ハロゲンもしくはニトロ基、またはメチレンジオキシ基で1回置換されたもの； β -2-および3-チエニルアラニン； β -2-および3-フラニルアラニン； β -2-、3-および4-ピリジルアラニン； β -(ベンゾチエニル-2-および3-イル)アラニン； β -(1-および2-ナフチル)アラニン；セリン、スレオニンまたはチロシンのO-アルキル化誘導体；S-アルキル化システイン、S-アルキル化ホモシステ

20

イン、チロシンのO-スルフェートエステル、O-ホスフェートエステルおよびO-カルボン酸エステル；3-(スルホ)チロシン、3-(カルボキシ)チロシン、3-(ホスホ)チロシン、チロシンの4-メタンスルホン酸エステル、チロシンの4-メタンホスホン酸エステル、3,5-ジヨードチロシン、3-ニトロチロシン、 ϵ -アルキルリジン、および δ -アルキルオルニチン。任意のこれらの α -アミノ酸は、 α 位でメチル基により、 α -アミノ側鎖上の芳香族残基の任意の位置でハロゲンにより、または側鎖残基のO、NまたはS原子で適切な保護基により置換され得る。適切な保護基は上述されている。

当業者に公知の溶媒および他の条件の選択に依存して、本発明の化合物はまた、ヘミケタール、ヘミアセタール、ケタールまたはアセタール形態であり得、これらの形態は本発明に含まれる。

さらに、本発明の化合物の平衡形態は、互変異性形態を含み得ることが理解されるべきである。これらの化合物のこのような形態の全ては、本発明に明らかに含まれる。

本発明の方法で有用な化合物は、選択的生物学的性質を増強するために、好適な官能基によって改変され得る。そのような改変は、当該分野に公知であり、そして所定の生物学的系（例えば、血液、リンパ系、中枢神経系）への生物学的浸透の増大、経口アベイラビリティの増大、注入による投与を可能にする可溶性の増大、代謝の改変、および発揮率(rate of exertion)の改変を含む。さらに、これらの化合物は、プロドラッグ形態に改変され得、それによってプロドラッグに対する代謝または他の生化学的過程の作用の結果として、所望される化合物が患者の体内で形成される。いくつかの化合物のプロドラッグ形態の例は、特にこれらが式Iの「A」基または「A」基に結合した改変アスパラギン残基もしくはグルタミン残基に見いだされる場合には、ケトンまたはアルデヒド基を含む化合物のケタール、アセタール、オキシムおよびヒドラゾン形態が挙げられる。

40

上記式1または下記式3では、nが1のときに、最適化合物の群が存在し、Bが水素原子のとき、さらに最適であり、 R^3 が水素原子またはt-ブチル基のとき、特に最適である。この群の化合物のうち、注目すべきものには、Aが天然に生じるアミノ酸のときのものである。この後者の群の化合物は、本明細書中では、「4-オキシブタン酸化合物」と呼ばれる。

この群の4-オキシブタン酸化合物には、 R^1 がメチル基である最適化合物、すなわち、N-メチルインドール化合物がある。この群のN-メチルインドール化合物の1実施態様は、Aが、アラニン、バリン、ロイシン、フェニルアラニン、グリシンまたはプロリン残基のとき

50

に、存在する。これらの群の天然アミノ酸N-メチルインドール化合物の各1個のうち、注目すべき化合物は、このN-メチルインドールが他には置換されていないとき、すなわち、ここで、X、Yおよび R^2 が水素原子であるとき、最適には、 R^3 が水素原子であるとき、存在する。

他の最適な群の4-オキソブタン酸化合物は、N-ベンジルインドール化合物からなる。例えば、ある群のN-ベンジルインドール化合物は、Aがアラニン残基のときに、存在する。この群のアラニン化合物のうち、注目すべきものには、X、Yおよび R^2 がそれぞれ水素原子であるもの、特に、 R^3 が水素原子であるものがある。

別の最適な群の4-オキソブタン酸化合物は、そのインドール基のN-置換基が1-ブテニル基であるときに、存在する。この群のN-(1-ブテニル)インドール化合物の1実施態様は、Aがバリン残基のとき、特に、X、Yおよび R^2 がそれぞれ水素原子であるとき、存在する。この後者の群の化合物の最適な群は、 R^3 が水素原子であるとき、存在する。

さらに他の群の最適な4-オキソブタン酸化合物は、そのインドール環のN-置換基が2'-酢酸残基であるときに、存在する。N-(2'-酢酸化合物)の代表的な群は、Aがアラニン残基のとき、存在する。この特定の群のアラニン化合物の1実施態様は、X、Yおよび R^2 がそれぞれ水素原子であるとき、特に、 R^3 が水素原子であるとき、存在する。

インドール基を、その窒素上で、3'-プロピオン酸残基で置換したときの4-オキソブタン酸化合物の群は、本発明の他の例である。このようなN-(プロピオン酸)インドール化合物の最適な群は、Aがアラニン残基のとき、存在する。この群のアラニン化合物のうち、注目すべきものは、X、Yおよび R^2 がそれぞれ水素原子であるもの、特に、 R^3 が水素原子であるものがある。

他の最適な群の式1の化合物は、nが1であるとき、存在し、Bがモノフルオロメチル基であるとき、さらに最適である。これらのモノフルオロメチル化合物の1実施態様は、 R^3 が水素原子またはt-ブチル基のとき、存在し、Aが中性アミノ基のとき、さらに最適である。Aが中性アミノ基であるこれらの化合物の一例は、Aがバリン残基であるとき、存在する。この後者の群のバリン化合物は、本明細書中では、「4-オキソ-5-(フルオロペンタン酸)化合物」と呼ばれる。

4-オキソ-5-(フルオロペンタン酸)化合物の最適な一群は、 R^1 がメチル基であるとき、存在し、言い換えれば、N-メチルインドール化合物である。このようなN-メチルインドール化合物の代表的な例は、 R^2 がメチル基であり、かつXおよびYがそれぞれ水素原子であるとき、特に、 R^3 が水素原子であるとき、存在する。このようなN-メチルインドール化合物の他の代表的な群は、 R^2 が塩素原子であり、かつXおよびYがそれぞれ水素原子であるとき、特に、 R^3 が水素原子であるとき、存在する。N-メチルインドール化合物の第三の代表的な群は、 R^2 がクロ基であり、Xが5-フルオロ基であり、かつYが水素原子であるとき、特に、 R^3 が水素原子であるとき、存在する。

他の最適な4-オキソ-5-(フルオロペンタン酸)化合物は、N-(3'-フェニルプロピ-1-イル)インドール化合物から構成される。この後者のクラスの化合物のうち、注目すべき群は、 R^2 、XおよびYがそれぞれ水素原子であるとき、特に、 R^3 が水素原子であるとき、存在する。

第三の最適な群の4-オキソ-5-(フルオロペンタン酸)化合物は、N-(カルボキシメチルまたは保護カルボキシメチル)インドール部分を有する。この群の1実施態様は、 R^2 、XおよびYがそれぞれ水素原子であるとき、特に、 R^3 が水素原子であり、かつこのインドール環の窒素原子がカルボキシメチル基で置換されているとき、存在する。

他の最適なクラスの式I化合物は、nが1であり、かつBが(2,6-ジクロロベンジルオキシ)メチル基のとき、特に、 R^3 が水素原子またはt-ブチル基であり、かつAが中性アミノ酸のとき、存在する。このような化合物の例は、 R^1 がメチル基のとき、特に、 R^2 がメチル基のとき、存在する。

式Iの化合物は、以下で述べるような通常の方法を用いて、合成できる。有利なことに、これらの化合物は、容易に入手できる出発物質から好都合に合成される。

化合物を合成する他の合成経路は、以下のスキームIに示す：

10

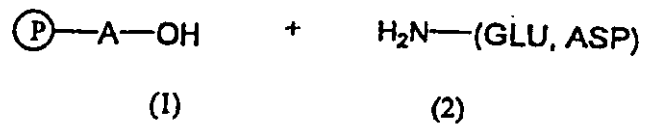
20

30

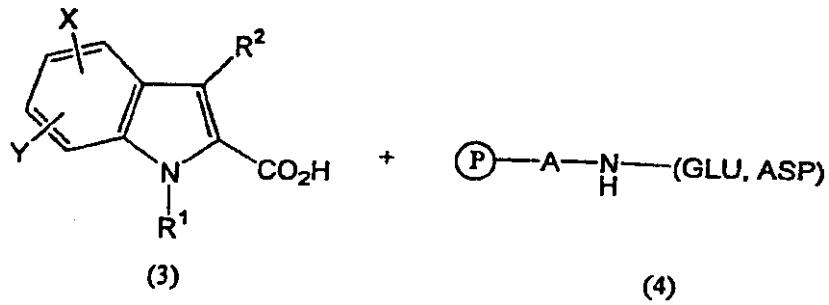
40

50

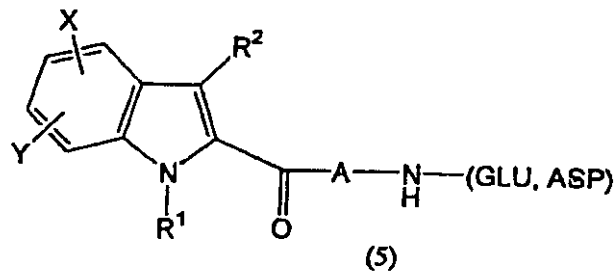
スキーム I



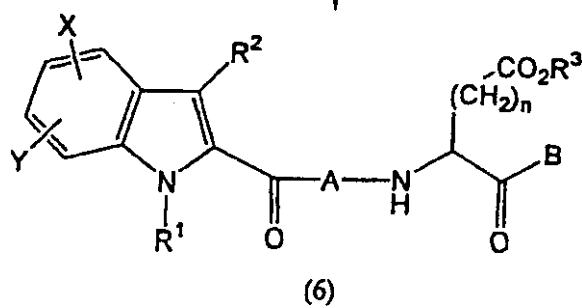
工程 A



工程 B



工程 C



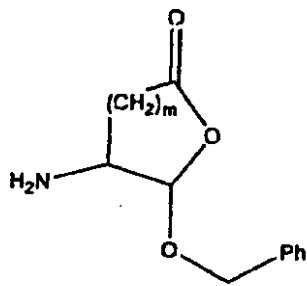
上記スキーム I では、式 (2)、すなわち、 $\text{H}_2\text{N}-(\text{Glu, Asp})$ は、式 2a~2d のアスパラギン酸またはグルタミン酸残基である：

10

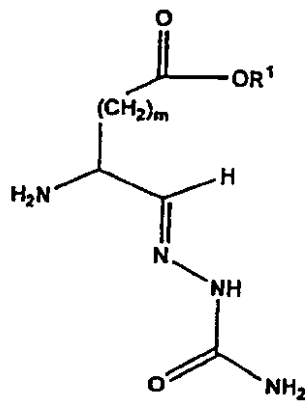
20

30

40

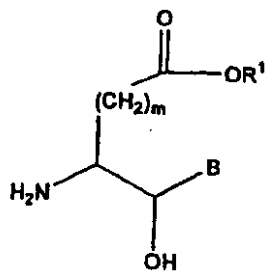


式 2a ;

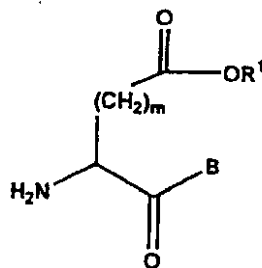


式 2b ;

10



式 2c; または



式 2d.

20

上記スキーム I では、p は、アミノ保護基を表わし、そして(A)は、上で述べたように、天然または非天然アミノ酸である。

30

式2a~dの改変アスパラギン酸またはグルタミン酸は、当該分野で周知の方法で作製され得る。例えば、欧州特許出願第519,748号；PCT特許出願番号PCT/EP92/02472；PCT特許出願番号PCT/US91/06595；PCT特許出願番号PCT/US91/02339；欧州特許出願第623,592号；国際特許出願番号W093/09135；PCT特許出願番号PCT/US94/08868；欧州特許出願第623,606号；欧州特許出願第618,223号；欧州特許出願第533,226号；欧州特許出願第528,487号；欧州特許出願第618,233号；PCT特許出願番号PCT/EP92/02472；国際特許出願番号W093/09135；PCT特許出願番号PCT/US93/03589；およびPCT特許出願番号PCT/US93/00481（これらは全て本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

工程Aで起こるカップリング反応は、J. Jones, "Amino Acid and Peptide Synthesis," Steven G. Davis編、Oxford University Press、Oxford、25-41頁(1992)；M. Bodanzky, "Principles of Peptide Synthesis," Hafnerら編、Springer-Verlag、Berlin Heidelberg、9-52頁および202-251頁(1984)；M. Bodanzky, "Peptide Chemistry, A Practical Textbook," Springer-Verlag、Berlin Heidelberg、55-73頁および129-180頁；およびStewartならびにYoung, "Solid Phase Peptide Synthesis," Pierce Chemical Company(1984)(これらの全ての内容は、本明細書中で参考として援用されている)で述べているように、標準的なペプチドカップリング剤(例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)および1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール(HOBt)の組み合わせ、ならびにBOP(ベンゾトリアゾリルオキシ-トリオ-(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート)試薬、pyBOP(ベンゾトリアゾリルオキシ-トリス(N-ピロリジニル)ホスホニウムヘキサフルオロホス

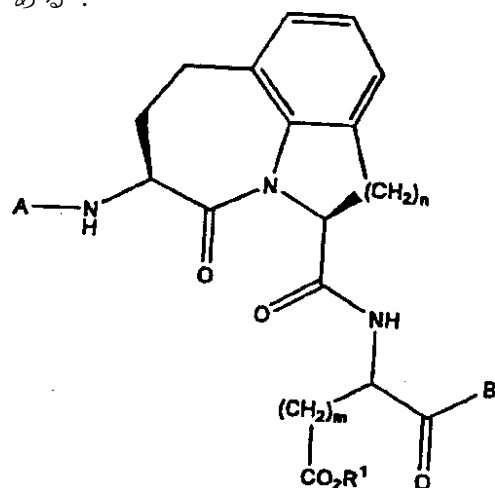
40

50

フェート)、HBTU(0-ベンゾトリアゾリル-テトラメチルイソウロニウム-ヘキサフルオロホスフェート)およびEEDQ(1-エチルオキシカルボニル-2-エチルオキシ-1,2-ジヒドロキノリン)との組み合わせ、1-エチル(3,3'-ジメチル-1'-アミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)およびHOBtの組み合わせなどの存在下にて、行われる。このアミノ保護基は、次いで、除去され、得られたアミンは、(3)の2-(カルボキシ)インドールとカップリングされる(工程B)。再度、このカップリング反応は、前記の標準的なペプチドカップリング反応を使用する。(3)のインドール環は、工程Bでの反応前またはその後で置換できる。このようなインドール環の合成および置換反応は、例えば、Brown, R.T. and Joule, J.A. in "Heterocyclic chemistry (P.G. Sammes編)(Vol. 4 of Comprehensive Organic Chemistry, D. BartonおよびW.D. Ollis編)、(1979)、Pergamon Press, Oxford; Houlihan, W.J.編、in "Indoles (The Chemistry of Heterocyclic Compounds [A. WeissburgerおよびE.C. Taylor編], Vol. 25, Parts 1-3)、Wiley Interscience, New York(1972): およびSaxton, J.E.編、in "Indoles (The Chemistry of Heterocyclic Compounds), "A. WeissburgerおよびE.C. Taylor編], Vol. 25, Part 4)、Wiley Interscience, New York(1979)(これらの全ての内容は、本明細書中で参考として援用されている)で記述しているように、周知である。

このカップリング反応が式2cのアミノアルコールを用いて行われる場合には、そのアルコール部分は、この保護基の除去前に、対応するカルボニル化合物に酸化されなければならない。この酸化反応の好ましい方法には、Swern酸化(-78℃でのオキサリルクロライド-ジメチルスルホキシド、塩化メチレンに続いて、トリエチルアミン); およびDess-Martin酸化(Dess-Martinペリオジナン(periodinane)、t-ブタノールおよび塩化メチレン)が挙げられる。式2a-dおよびAの副構造に含有される保護基は、当該技術分野で周知の方法により、除去される。これらの保護基の一部または前部の反応および除去は、上記スキームの工程Cに含まれる。

以下の式3の化合物およびそれらの薬学的に受容可能な塩もまた、本発明の方法で有用である:



式 3

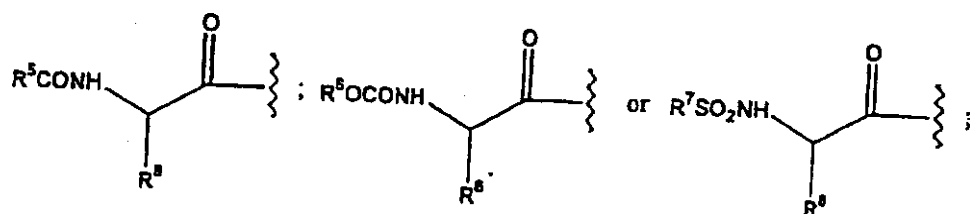
ここで:

nは、1または2である;

mは、1または2である;

Aは、 R^2CO- 、 $R^3-O-CO-$ または R^4SO_2- ;

次式の基:



さらに、ここで：

R^1 は、水素原子、アルキルまたはフェニルアルキルである；

R^2 は、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、フェニルアルキル、(置換)フェニル、(置換フェニル)アルキル、ヘテロアリールまたは(ヘテロアリール)アルキルである；

10

R^3 は、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニルアルキルまたは(置換フェニル)アルキルである；

R^4 は、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、(置換フェニル)アルキル、ヘテロアリールまたは(ヘテロアリール)アルキルである；

R^5 は、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、(置換フェニル)アルキル、ヘテロアリールまたは(ヘテロアリール)アルキルである；

R^6 は、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニルアルキルまたは(置換フェニル)アルキルである；

20

R^7 は、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、(置換フェニル)アルキル、ヘテロアリールまたは(ヘテロアリール)アルキルである；

R^8 は、天然または非天然アミノ酸からなる群から選択したアミノ酸側鎖である；

Bは、水素原子、重水素原子、アルキル、シクロアルキル、(シクロアルキル)アルキル、フェニル、フェニルアルキル、(置換)フェニル、(置換)フェニルアルキル、ヘテロアリール、(ヘテロアリール)アルキルまたはハロメチル；

次式の基：

$-\text{CH}_2\text{XR}^9$ ；

30

ここで、 R^9 は、フェニル、フェニルアルキル、置換フェニル、(置換)フェニルアルキル、ヘテロアリールまたは(ヘテロアリール)アルキルである；そしてXは、酸素原子またはイオウ原子である；

次式の基：

$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ (アリール)；

次式の基：

$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-$ (ヘテロアリール)；

次式の基である：

$-\text{CH}_2-\text{O}-\text{PO}(\text{R}^{10})\text{R}^{11}$ ；

ここで、 R^{10} および R^{11} は、独立して、アルキル、シクロアルキル、フェニル、(置換)フェニル、フェニルアルキルおよび(置換フェニル)アルキルからなる群から選択される；

40

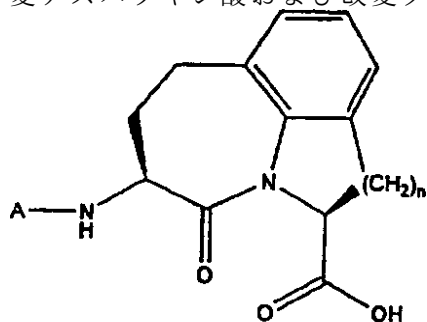
式3の化合物は、溶媒和物および水和物としても存在し得る。それゆえ、これらの化合物は、例えば、水和水、または多数の母液溶媒の分子またはそれらの任意の画分で、結晶化できる。このような化合物の溶媒和物および水和物は、本発明の範囲内に含まれる。

本発明の式1および3の化合物は、通常の方法を用いて合成できる。有利には、これらの化合物は、容易に入手できる出発物質から便利に合成される。

それゆえ、式3の化合物は、一般に、J. Jones, "Amino Acid and Peptide Synthesis," Steven G. Davis編、Oxford University Press, Oxford, 25-41頁(1992)(これは本明細書中で参考として援用されている)で述べられているように、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)-1-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール(HOBt)、BOP試薬、pyBOP、TBTU、EEDQ、1-

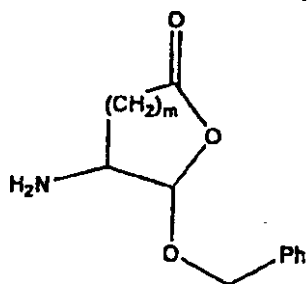
50

エチル(3,3'-ジメチル-1'-アミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)-HOBtなどのような標準的なペプチドカップリング剤の存在下にて式4で以下で示した3環式の核を、式5a-dの改変アスパラギン酸および改変グルタミン酸残基と組み合わせることにより、合成できる：

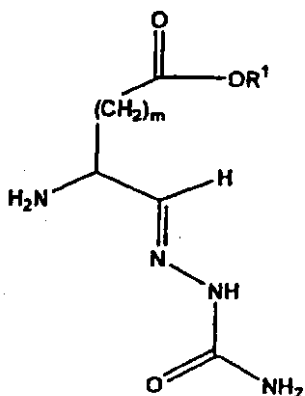


10

式 4



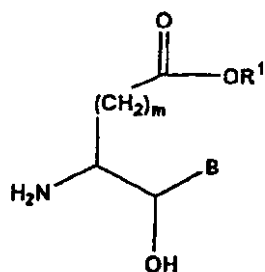
式 5a ;



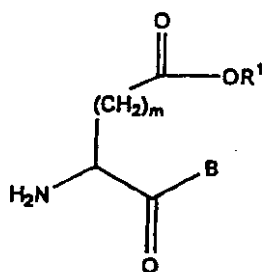
式 5b ;

20

30



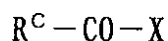
式 5c; または



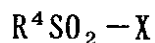
式 5d

40

アミノ保護基は、次いで、除去され、得られたアミンは、式6の置換アシル基または式7のスルホニル基と組み合わせられる：



式6



式7

上式では、 R^1 は、上で定義したものと同一であり、そして R^C は、 R^2 、 R^3-O 、 R^4 、または式3のA基について定義した R^8 を含有する側鎖である。もちろん、このような部分は、この

10

カップリング反応(式5a-d)、アシル化反応(式4)またはスルホン化反応(式7)を妨害しないような保護形状にて、任意のヒドロキシ基、カルボニル基またはアミノ基を有する。上式でのXは、このアシル化反応またはスルホン化反応のための促進脱離基を表わす。このカップリング反応が式5cのアミノアルコールを用いて行われる場合には、そのアルコール部分は、この保護基の除去前に、対応するカルボニル化合物に酸化しなければならない。この酸化反応の好ましい方法には、Swern酸化(−78℃でのオキサリルクロライド-ジメチルスルホキシド、塩化メチレンに続いて、トリエチルアミン)；およびDess-Martin酸化(Dess-Martinペリオデナン(periodinane)、t-ブタノールおよび塩化メチレン)が挙げられる。式5a-dおよびAの副構造に含有される保護基は、当該技術分野で周知の方法により、除去される。

20

式3の3環式の核は、当該技術分野で周知の方法により、合成される。例えば、1996年4月2日に発行されたD.S. Karanewsky、米国特許第5,504,080号；J.A. Roblら、Tetrahedron Letters, 36: 1593-1596 (1995)；およびS. De Lombaertら、Tetrahedron Letters 35: 7513-7516 (1994)（これらの全ての内容は、本明細書中で参考として援用されている）を参照のこと。

式5a～dの改変アスパラギン酸またはグルタミン酸は、当該分野で周知の方法で作製され得る。例えば、欧州特許出願第519,748号；PCT特許出願番号PCT/EP92/02472；PCT特許出願番号PCT/US91/06595；PCT特許出願番号PCT/US91/02339；欧州特許出願第623,592号；国際特許出願番号W093/09135；PCT特許出願番号PCT/US94/08868；欧州特許出願第623,606号；欧州特許出願第618,223号；欧州特許出願第533,226号；欧州特許出願第528,487号；欧

30

州特許出願第618,233号；PCT特許出願番号PCT/EP92/02472；国際特許出願番号W093/09135；PCT特許出願番号PCT/US93/03589；およびPCT特許出願番号PCT/US93/00481（これらは全て本明細書中に参考として援用される）を参照のこと。

式6のアシル基および対応する R^4SO_2 基はまた、当該技術分野で周知の方法により、合成される。例えば、1996年4月2日に出版された米国特許第5,504,080号(その内容は、本明細書中で参考として援用されている)を参照のこと。この基は、一旦、この3環式の核に結合すると、加工できるものの、それは、この核に結合する前は、インタクトであるのが好ましい。

一旦、式5および式6または式7の側鎖が、式3の3環式の核に結合すると、当業者は、合成した分子の活性を高めるために、通常、任意のアミノ基、ヒドロキシ基またはカルボ

40

アポトーシスを防止する方法

本発明は、ICE/CED-3ファミリーのメンバーにより、プログラムされた細胞死、すなわちアポトーシスを防止する方法を提供する。本発明は、ICE/CED-3酵素活性のインヒビターのための新規な用途だけでなく、ICE/CED-3ファミリーをコードする遺伝子の発現を特異的に防止する任意の方法を提供する。それゆえ、ICE/CED-3ファミリーメンバーと相補的なヌクレオチド配列から構成され関連タンパク質の転写または翻訳を阻害できるアンチセンスRNAまたはDNA、ICE/CED-3プロテアーゼ(例えば、その活性部位システインを、セリンまたはアラニンのような他のアミノ酸で置き換えるように設計した突然変異株)のドミナントネガティブな形態の発現、またはICE/CED-3ファミリーポリペプチドに結合する抗体

50

は、ペプチドを含めた低分子インヒビター(特に、本明細書中で提示した化合物)と同様に、本発明の範囲内である。

第一局面では、本発明は、造血および血液細胞集団を拡大するかまたはこのような集団の生存を延長する方法を提供し、この方法は、この細胞を、1個以上のICE/CED-3ファミリーのメンバーの活性を抑制する効果的な量の試薬と接触させて、未成熟な前駆体および/または成熟細胞のプログラムされた細胞死を阻害し、それにより、この細胞集団の生存を拡大および/または高めることを包含する。本明細書中で使用する「拡大」または「拡大する」との用語は、現存している細胞集団の細胞数を増やすことを意味する。「生存」との用語は、典型的には、エクスピボにて、細胞の生存能を維持することを意味するが、しかしながら、この用語は、同様に、インビボも含むことを意味する。生存は、数時間から数日またはそれより長時間であり得る。

この方法は、所望の細胞を、ICE/CED-3ファミリーの活性を抑制する阻害有効量の試薬と接触させることを包含する。本明細書中で使用する「接触させる」との用語は、インヒビターがICE/CED-3の活性を効果的に阻害して、それにより細胞のアポトーシスを阻害し細胞を増殖させ蓄積させるように、この細胞をICE/CED-3ファミリーインヒビターに晒すことを意味する。「阻害有効量」との用語は、インタクトの標的細胞内のICE/CED-3酵素活性を効果的にブロックするICE/CED-3インヒビターの量を意味する。本発明の方法では、1種以上のICE/CED-3ファミリーインヒビターが同時に使用できることが明らかである。好ましい実施態様では、接触は、細胞集団の拡大が必要な検体(例えば、最近化学療法を受けた検体)へのICE/CED-3インヒビターのインビボ投薬であり得る。このような試薬の例は、Cbz-ValAlaAsp-CH₂F、Cbz-ValAlaAsp-CH₂OCO(2,6-ジCl-C₆H₄)、Cbz-ValAlaAsp-CH₂Fメチルエステル、Ac-AspValAlaAsp-CH₂Fを含めて、当該技術分野で一般的に知られている。代表的な化合物には、前出の式1および式3が挙げられる。

ICE/CED-3活性の検出は、標準的な方法(例えば、関連ペプチド(例えば、Ac-DEVD)-amcと共役したアミノメチルクマリン(AMC)の酵素的切断により生じた蛍光を測定する酵素アッセイ)による。このようなアッセイは、当該技術分野で標準的である(Armstrongら、J. Biol. Chem. 271: 16850、1996; Fernandes-Alnemriら、Cancer Res., 55: 6045、1995)。加えて、ICE活性の阻害は、IL-1βの生物検定により、測定できる。ICE/CED-3活性は、好ましくは、ICE/CED-3ファミリーインヒビターにより、少なくとも約75%まで、好ましくは、約90%まで抑制される。

「細胞」または「細胞集団」には、前駆細胞(例えば、多分化能幹細胞)および/または分化した成熟細胞が含まれる。拡大した細胞および/またはその生存が本発明の方法により拡大された細胞の例には、顆粒球(例えば、好中球)、単核細胞、赤血球、リンパ球および血小板が挙げられる。

造血の成功はまた、血球容量、白血球数、脾臓または骨髄から骨髄DNAへの粉碎チミジンの含入、脾臓の重量、バースト形成(burst-forming)単位-赤血球の数またはコロニー形成単位(赤血球、顆粒球/マクロファージおよび巨核球形成系列)を測定することにより、検出できる。

造血疾患は、一次疾患の結果としてまたは他の疾患の治療の結果として、起こり得る。例えば、放射線療法また化学療法の重大な副作用には、骨髄抑制がある。骨髄移植に続いて、汎血球減少が認められ得、重症の白血球減少症は、しばしば、エイズで認められる。慢性腎不全があって透析を受けている患者、しばしば、貧血がある。AZTで治療を受けているエイズ患者は、白金で治療している癌患者、およびリウマチ性関節炎のある貧血患者は、しばしば、貧血および白血球減少のために、輸血が必要である。種々の造血成長因子(例えば、エリスロポエチン、顆粒球、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子)、またはサイトカイン(例えば、インターロイキン-1)は、造血を刺激することが知られており、これらの病態を治療するのに使用されている。しかしながら、治療時間は、一般に、およそ数週間であり、特に、好中球減少の場合には、患者は、日和見感染の危険がある。それゆえ、低分子(例えば、ICE/CED-3インヒビター)を、単独でまたは造血回復を速める成長因子と組み合わせて、投与することが有利である。造血成長因子を含む種々のサイトカイ

10

20

30

40

50

ンは、増殖を高めるだけでなく、標的細胞のアポトーシスを抑制することが知られている (KouryおよびBondurant、Science、248: 378、1990; MutaおよびKrantz、J. Cell Physiol.、156: 264、1993)。しかしながら、これらの試薬は、アポトーシス細胞機構の上流で作用し、その機構に間接的に影響を及ぼすにすぎない。本発明は、このアポトーシス機構を直接的に阻害することにより、細胞を増やす方法を提供する。本発明の方法と共に造血成長因子を投与することを包含する組み合わせ治療は、好ましい実施態様である。

本発明の方法は、骨髄の再形成が必要な個体にて、正常な造血を回復させるのに有用である。この多分化能幹細胞は、自己更新のための独特の性能、および顆粒球、単核細胞、赤血球、巨核球およびリンパ球系列の成長および分化の可能性を有する。

当業者も理解できるように、幹細胞は、適当な造血成長因子または成長因子の組み合わせを用いたインキュベーションにより、リンパ球、骨髄また赤血球系列の集団としての分化に関する。従って、本発明の方法は、さらに、これらの細胞を、このICE/CED-3インヒビターに加えて、適当な造血成長因子と接触させることを包含する。本明細書中で使用する「適当な造血成長因子」との用語は、祖先の幹細胞を所望のリンパ球、顆粒球、単核細胞、巨核球または赤血球系列の細胞集団に向けるための当該技術分野で公知の1種以上の造血成長因子を意味する。種々の成長因子が、細胞の増殖を促進することおよびアポトーシスを阻害することの両方により、機能する。これらの両方は、細胞の蓄積を促進する機能がある。ある種の造血成長因子(G-CSF、GM-CSFおよびエリスロポエチンを含めて)は、それらの各個の標的細胞のプログラムされた細胞死を阻害でき、および、それらの細胞の増殖を刺激できるような成長因子の例である。これらの因子は、患者の顆粒球(好中球)、単核細胞および赤血球の再増殖を促進する際に、臨床的に、有用であることが分かっている。G-CSFおよびGM-CSFは、しばしば、化学療法または放射線療法に続いて患者に使用され、エリスロポエチンは、一般的に、腎透析を受けた患者に使用される。これらの目的に使用できる当該技術分野で公知の他の代表的な成長因子には、IL-1、IL-6、幹細胞およびIL-3がある。造血系を刺激する他の成長因子は、当業者に公知である(例えば、Harrison's Principles of Internal Medicine、Isselbacherら著、pp 1714-1711、McGraw Hill、1994(これらの内容は、本明細書中で参考として援用されている)を参照のこと)。

アポトーシスインヒビター(例えば、ICE/CED-3インヒビター)は、成熟血球自体の生存を延長できるだけでなく、骨髄中の血球前駆体の生存を延長できる。成熟血球の生存の延長に関して、これは、(骨髄移植と共にまたはそれなしで)化学療法および/または放射線療法に続いた顆粒球の再増殖に、特に有益であり得る。成熟顆粒球(特に、好中球)は、血流中にて、24時間生存するにすぎず、その後、アポトーシスにより死滅する。アポトーシスをブロックし好中球の生存を増やすICE/CED-3インヒビターは、患者がその白血球数を正常化する速度を速める。最終的に成熟細胞集団を生じる前駆細胞でのアポトーシスの抑制は、成熟細胞への効果と相乗的である。

本発明は、さらなる顆粒球の必要な受血者への引き続いた輸血のためのエキスピボでの好中球/顆粒球の生存能を保持する方法を提供する。供血者から取り出した顆粒球の寿命は限られており、それゆえ、輸血に機能する顆粒球を供給するのは困難である。

本発明の試薬は、可逆的または不可逆的な様式で、ICE/CED-3ファミリーのメンバーの触媒活性を抑制するという点で、「ICE/CED-3インヒビター」である。本明細書中で使用する「不可逆的」との用語は、このインヒビターとICE/CED-3ファミリーメンバーとの間の共有結合の形成を意味する。可逆インヒビターとなるものに不可逆「弾頭(warhead)」を組み込むことにより、可逆インヒビターを不可逆インヒビターに変えることも可能である。

ICE/CED-3阻害の可逆性は、一般に、その分子内の電気陰性基の機能である。この電気陰性基がジアゾアルキルケトンのとき、ICEの阻害は不可逆的であり、この化合物は、不可逆インヒビターである。この電気陰性基がアルデヒドのとき、ICEの阻害は可逆的であり、このインヒビターは、可逆インヒビターである。

本発明の化合物は、好ましくは、アルデヒド、ジアゾアルキルケトン、ハロアルキルケトンまたはアシルオキシメチルケトンである。電気陰性基に関して本明細書中で使用する「

10

20

30

40

50

アルキル」との用語は、1個～3個の炭素原子を有する線状または分枝鎖基であり、これは、必要に応じて、置換されていてもよい。代表的なアルキル基には、メチル、エチル、プロピルなどが挙げられる。必要に応じて、この電気陰性基は、アルデヒド、フルオロメチル(CH₂F)ケトンまたはアシルオキシメチルケトンである。

本発明の化合物は、当業者に公知であり容易に明らかな方法に一般に対応する方法により、製造される。Kettaerら、Arch, Biochem, Biophys., 162:56、1974；米国特許第4,582,821号；同4,644,055号；Kettlerら、Arch, Biochem. Biophys., 165:739、1974；DakinおよびWest、J. Biol. Chem., 78:91、1928；Rasnack, D., Anal. Biochem., 149:461、1985；Revesz, L., Tetrahedron Lett., 35:9693、1994、を参照のこと。代表的なインドイルジペプチドおよび3環式化合物は、本明細書中で提供されている。

10

非フルオロハロアルキルケトン電気陰性残基を有する化合物は、好ましくは、Kettner法に従って、合成される。N-ブロック化アミノ酸またはペプチドは、N-メチルモルホリンおよびアルキル非フロオロハロホルメートと反応されて、ペプチド-酸無水物が生成する。この無水物は、次いで、非プロトン性無水溶媒中で、ジアゾアルカンと反応されて、ペプチド-ジアゾメタンケトンを形成する。このジアゾメタンケトンは、次いで、HCl、HBrまたはHIの無水溶液と反応して、所望のN-ブロック化C-末端ハロアルキルケトンペプチドまたはアミノ酸が生成する。

フルオロメチル電気陰性残基を有する化合物は、好ましくは、Revesz法により、合成される。N-ブロック化ペプチドまたはアミノ酸は、標準的なペプチドカップリング剤(例えば、ジシクロヘキシルカルボジイミド-ヒドロキシ-ベンゾトリアゾール)の存在下にて、t-ブチル(3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロ)ペンタノエートと反応される。得られた生成物は、Severn酸化またはDess-Martin酸化のいずれかにより、対応するケトンに酸化される。最終的に、トリフルオロ酢酸によるこのt-ブチルエステルの脱保護により、対応するカルボン酸が得られる。

20

フルオロアルキルケトン電気陰性残基を有する化合物は、そのN-末端ブロック基を除去し、その脱保護化合物を他の保護アミノ酸とカップリングさせることにより、そのN-末端方向に伸長できる。Bodanszky、The Practice of Peptide Synthesis、Springer-Verlag、Berlin、1984。他方、脱保護化合物はアシル化されて、N-末端アセチル保護基を有する化合物を生じる。Stewartら、Solid Phase Petide Synthesis、Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1984。

30

他の実施態様では、本発明は、移植用器官の生存能を延長する方法を提供し、この方法は、移植用の器官の細胞を、インターロイキン-1 β -転換酵素の(ICE)/CED-3活性を抑制する阻害有効量の試薬と接触させて、それにより、未処理の器官と比較して、この器官の生存能を延長することを包含する。「器官」との用語は、無傷の多細胞器官(例えば、脾臓、肝臓または心臓)；多細胞器官(例えば、ドーパミン作動性ニューロン中のランゲルハンス島細胞)に由来の懸濁液だけでなく、血球または造血前駆細胞の懸濁液を含むことを意味する。好ましくは、この器官は、移植用の器官を保存するために、エクスピボで処理される。「延長する」との用語は、移植用の器官が、本発明の方法を用いた治療により、ICE/CED-3インヒビターで治療していない類似の器官と比較して、保存されることを意味する。特定の理論に束縛されることは望まないものの、移植用の器官の細胞をICE/CED-3インヒビターと接触させると、プログラムされた細胞死が阻害され、それにより、この器官が保存されて生存能が延長され则认为られる。

40

本発明の方法は、移植の前または移植に続いて、ドナー器官の細胞のアポトーシスを阻害するための遺伝的に改変された、またはICE/CED-3インヒビターで浸したドナー器官、および必要に応じて、免疫抑制剤で、レシピエントを処置することを包含する。

本発明は、種々の臨床用途(遺伝子治療、骨髄移植の増強、および骨髄移植の代替を含めて)に有用な造血細胞のエクスピボ拡張または生存を包含する。従って、顆粒球、赤血球および/または血小板の集団のエクスピボ拡張および/または生存を促進するために、アポトーシス機構のインヒビター(例えば、ICE/CED-3ファミリーインヒビター)を使用することは、有用な方法である。例えば、検体から単離した細胞の組織培養物に、または、この

50

ような細胞に対して操作可能なICE/CED-3インヒビターをコードするポリヌクレオチド(例えば、アンチセンス)を含有する発現ベクターで形質移入することによって、ICE/CED-3インヒビターを添加し得る。

本発明の方法は、治療上の有用性を有する。例えば、当該技術分野での標準的な方法により得た多分化能造血幹細胞(HSC)の懸濁液は、本発明の方法により処理でき、そしてレシピエントの造血再形成を行うのに使用できる。例えば、エクスピボ治療としては、レシピエントに由来の(自己再形成)またはレシピエント以外の個体に由来の(非自己再形成)豊富な多分化能幹細胞は拡張でき、そして種々の病気または疾患(例えば、貧血、悪性自己免疫疾患、および種々の免疫不全および欠乏症)の治療または予防だけでなく、造血細胞の蓄えが枯渇しているレシピエント(例えば、化学療法剤または放射性剤の治療を受けたレ
10
レシピエントまたはエイズを罹患したレシピエント)で、使用できる。本発明の化合物の他の治療用途は、当業者に周知である。移植した細胞の処理は、エクスピボで、および移植に続いてインビボでの両方であり得る。

本発明をヒトレシピエントのための非自己ドナー器官に適用する方法の一例は、以下である：移植の1週間前から始めて、レシピエントは、誘発免疫応答の可能性を減らすために、シクロホスファミドを投薬される。移植片の受容を高めるために、移植の少し前(1～3日前)に、免疫抑制投薬量のサイクロスポリンまたはFK506を開始してもよい。移植の直前で器官の除去前に、ドナーに、ICE/CED-3インヒビターを投薬してもよい。ドナーの器官は、移植前に除去するとすぐに、少なくとも1種のICE/CED-3インヒビター(例えば、ペ
20
プチドフルオロアルキルケトン)を含有する溶液でフラッシュされる。標準的な手術法による移植に続いて、患者は、典型的には、サイクロスポリンまたはFK506、シクロホスファミド、およびステロイド、および必要に応じて、ICE/CED-3インヒビターを用いた日常的な免疫抑制で維持される。免疫応答に関連した臨床的な徴候および症状に基づいて、種々の免疫抑制は、投薬量を低減する。

移植中に使用される免疫抑制剤には、サイクロスポリンA(CsA)のような試薬があるが、しかしながら、免疫抑制を起こす他の試薬(例えば、ラパマイシン、デオキシスベルグアリンおよびFK506、またはこれらの化合物の機能性等価物)もまた、使用できる。CsAは、好ましくは、免疫抑制用量での注射により、投与される。CsA治療の持続期間は、約2日間～約20日間の範囲であり得る。

移植前の器官生存を高めるために、このICE/CED-3ファミリーインヒビターは、切開した
30
器官を灌流するのに使用する液体に添加することにより、投与され得る。このICE/CED-3インヒビターを、また、器官の切開前のドナーに投与するなら、ICE/CED-3インヒビターは、任意の適当な手段(非経口投与、皮下投与、静脈内投与、動脈内投与または腹腔内投与を含めて)により、投与される。

任意の種に由来の任意の器官が移植できることが分かる。本発明の方法は、同じ種の移植(例えば、ヒトレシピエントおよび他のヒトドナー(同種異系移植または自己移植))または他の種(例えば、羊、ブタまたはヒトでない霊長類)からヒトレシピエントへの移植(異種移植)に使用する器官を保存するのに有用である。このような移植用組織には、心臓、肝臓、腎臓、肺、膵臓、ランゲルハンス島、脳組織、角膜、骨、腸、皮膚および造血細胞が
40
挙げられるが、これらに限定されない。ヒトは、好ましいレシピエントである。

ドナー(例えば、ブタ)に投与するICE/CED-3インヒビターの量、および移植する器官を治療するICE/CED-3インヒビターの量を決定するために、化合物は、血管系中のその濃度が、少なくとも、細胞培養物モデルのアポトーシスを阻害するのに必要な量と同程度であるように、投与される。種々の細胞培養物モデルは、当該技術分野で公知である(例えば、Armstrongら(上記); Schlegelら(上記); Boudreauら(上記))。このドナー器官、および必要に応じて、ドナーは、次いで、ドナーからの器官で認められる通常のアポトーシスの約10%未満までアポトーシスを低下させるために、ICEインヒビターを投薬される。従って、本明細書中で使用する「アポトーシス阻害」量との用語は、ICE活性および/またはアポ
50
トーシスを約75%、好ましくは、約90%阻害するICEインヒビターの量を意味する。

生物生産を高める方法

10

20

30

40

50

さらに他の実施態様では、本発明は、移植以外の用途のために、インビトロで培養した細胞の生存を高める方法を提供する。例えば、プログラムされた細胞死の抑制は、生物生産プロセスで使用される。例えば、組み換えタンパク質の産生では、培養した宿主細胞のアポトーシス細胞死により、収量が限定され得る。従って、ICE/CED-3インヒビターによる宿主細胞の処置、またはICE/CED-3と相補的なアンチセンスRNAまたはDNAを発現しICE/CED-3ファミリーメンバーの転写または翻訳を阻害できる宿主細胞を使用すること、またはICE/CED-3ファミリーインヒビターをコードする遺伝子を発現する宿主細胞を使用することは、細胞がより長く生存しそして所望の産生物をより長く生成および/または分泌可能にすることにより、生物生産を高め、それにより、高い収量の産生物が得られる。プログラムされた細胞死を防止する能力は、細胞が、通常必要な成長因子とは無関係に生存することを可能にし、培地補充の費用を低減する。

10

生物生産に有用なことを立証するために、有用な生成物(例えば、サイトカイン)を自然に産生する細胞株または有用な生成物(例えば、組み換えヒトエリスロポエチン、成長ホルモンまたはG-CSFを安定に発現するCOS細胞またはCHO細胞)を発現するために遺伝的に設計された細胞株は、発酵中にて、ICE/CED-3インヒビターと接触される。生物生産に対するICE/CED-3インヒビターの効果は、いくつかの方法で測定できる：1)異なる時点での培養物中のアポトーシス細胞の割合を決定すること；2)所望生成物の産生に関して、培養物の有用寿命を決定すること；3)細胞1グラムまたは培養物の1容量あたりの生成物の収量を測定すること；4)生成物の最終純度を測定すること。

生物生産の効率または全体的な生産性を増大させる方法は、天然生成物または組み換え生成物を生産するコストを低下させるので、有用である。哺乳類の細胞の発酵は、時間の経過につれて細胞生存能の低下により、限定される。発酵中の細胞死は、アポトーシスであることが示されており、それゆえ、アポトーシスインヒビターは、生物生産中の細胞生存能を高める。生物生産に使用される成長培地は、しばしば、細胞生存能を高めるために、血清なしで、成長因子で補足される。本発明のICE/CED-3インヒビターを用いた補足は、このような添加剤と置き換えるかまたはそれを増強するように設計されている。

20

薬学的組成物

本発明の薬学的組成物は、本発明の任意の化合物、およびその薬学的に受容可能な塩を、任意の薬学的に受容可能なキャリア、アジュバント、またはビヒクル（以後、まとめて「薬学的に受容可能なキャリア」とよぶ）と共に含む。本発明の薬学的組成物において使用され得る薬学的に受容可能なキャリア、アジュバント、およびビヒクルには、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンのような血清タンパク質、種々のリン酸塩のような緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質（例えば、硫酸プロタミン）、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアリーレート(polyarylate)、ワックス、ポリエチレン-ポリオキシプロピレン-ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、および羊毛脂(wool fat)などが包含されるが、これらに限定されない。

30

本発明の薬学的組成物は、経口的、非経口的、吸入スプレーにより、局所的、経直腸的、経鼻的、経頬的、経膈的、あるいは移植されたレザーバーを介して、投与され得る。経口および非経口投与が好ましい。本明細書中で使用される用語「非経口」は、皮下、皮内、静脈内、筋肉内、関節内、滑液内、胸骨内、包膜内、病変内(intralesional)、および頭蓋内の注射あるいは注入技術を包含する。

40

この薬学的組成物は、無菌の注射用調製物の形態、例えば、無菌の注射可能な水性または油性の懸濁液であり得る。この懸濁液は、当該分野で公知の技術に従って、適切な分散剤または湿潤剤（例えば、Tween 80のような）および懸濁剤を用いて処方され得る。無菌注射用製剤はまた、無毒性の非経口的に受容可能な希釈剤または溶媒中の、無菌の注射可能な溶液または懸濁液、例えば、1,3-ブタンジオール溶液であり得る。受容可能なビヒクルおよび溶媒の中でも、使用され得るのは、マンニトール、水、リンゲル液、および等張性

50

塩化ナトリウム溶液であり得る。さらに、無菌の不揮発性油が、溶媒または懸濁媒体として簡便に使用される。この目的のために、合成のモノ-またはジグリセリドを包含する任意の低刺激性の (bland) 不揮発性油が使用され得る。オレイン酸およびそのグリセリド誘導体のような脂肪油は注射剤の調製に有用であり、例えば、オリーブ油またはヒマシ油のような天然の薬学的に受容可能な油、特にそれらのポリオキシエチル化形態である。これらの油溶液または懸濁液は、長鎖アルコール希釈剤または分散剤をもまた含み得る。

本発明の薬学的組成物は、任意の経口的に受容可能な投薬形態（これにはカプセル、錠剤、ならびに水性懸濁液および溶液が包含されるがこれらに限定されない。）で経口投与され得る。経口用途の錠剤の場合、通常使用されるキャリアは、ラクトースおよびコーンスターチを包含する。ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤もまた典型的には添加される。カプセル形態での経口投与のために有用な希釈剤は、ラクトースおよび乾燥コーンスターチを包含する。水性懸濁液が経口投与される場合には、活性成分は乳化剤および懸濁剤と組み合わされる。所望であれば、特定の甘味剤および／または着香剤および／または着色剤が添加され得る。

本発明の薬学的組成物はまた、経直腸投与のための座剤の形態で投与され得る。これらの組成物は、本発明の化合物を、室温で固体であるが直腸温度で液体である適切な非刺激性の賦形剤と混合することによって調製され得る。そのような物質は、ココアバター、ミツロウ、およびポリエチレングリコールを包含するが、これらに限定されない。

本発明の薬学的組成物の局所投与は、所望の処置が局所適用で容易に到達可能な領域または器官に関連する場合に特に有用である。皮膚への局所適用のためには、薬学的組成物は、キャリア中に懸濁するかまたは溶解した活性成分を含む適切な軟骨で処方されるべきである。本発明の化合物の局所投与のためのキャリアは、鉱油、液体石油、白色石油、プロピレングリコール、ポリオキシエチレン、ポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックス、および水を包含するが、これらに限定されない。あるいは、薬学的組成物は、キャリア中に懸濁するかまたは溶解した活性化合物を含む適切なローションまたはクリームで処方され得る。適切なキャリアは、鉱物油、ソルビタンモノステアレート、ポリソルベート 60、セチルエステルワックス、セテアリールアルコール (cetearyl alcohol)、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール、および水を包含するが、これらに限定されない。本発明の薬学的組成物はまた、直腸座剤処方物によって、あるいは適切な浣腸処方物として、下部腸管に局所適用され得る。局所経皮パッチもまた本発明に包含される。

本発明の薬学的組成物は、経鼻エアロゾルまたは吸入によって投与され得る。そのような組成物は、薬剤処方の分野で周知の技術に従って調製され、そして生理食塩水中の溶液として、ベンジルアルコールまたは他の適切な防腐剤、バイオアベイラビリティを増強するための吸収促進剤、フッ化炭素、および／または当該分野で公知の他の可溶化剤または分散剤を用いて調製され得る。

本発明の化合物はまた、通常の抗炎症剤またはマトリックスメタロプロテアーゼインヒビター、IL-1 β 以外のサイトカインのリポキシゲナーゼインヒビターおよびアンタゴニストのいずれかと組み合わせ、使用できる。

本発明の化合物を他の薬剤との組み合わせの療法において投与する場合、それらは、順次または同時に患者に投与され得る。あるいは、本発明による薬学的組成物は、式 1 または 3 の化合物または本明細書中で記述の他の ICE インヒビターと他の治療剤または予防剤との組み合わせから構成され得る。

本発明の薬学的組成物によって処置または防止され得る疾患状態は炎症性疾患、自己免疫疾患および神経変性疾患、ならびに心臓に対する虚血性傷害（例えば、心筋梗塞）、脳に対する傷害（例えば、卒中）、および腎臓に対する傷害（例えば、虚血性腎疾患）のような虚血性傷害に関連する望まれないアポトーシスの阻害を包含するが、これらに限定されない。それらがアポトーシスを抑制する結果として、本発明の薬学的組成物はまた、化学療法後の患者の造血細胞の再増殖に有用である。有効量の上記薬学的組成物を、このような処置を必要とする（すなわち、炎症性疾患、自己免疫疾患、および神経変性疾患に罹患した患者および化学療法を受けるガン患者の造血細胞の再生）哺乳動物（本明細書におい

10

20

30

40

50

てはまた患者とも呼ぶ)に投与する方法は、本発明のさらなる局面である。最終的に、それらがアポトーシスを抑制する別の結果として、本発明の薬学的組成物は、移植に使用する器官の生存能を延長する方法で、使用できる。

処置または防止され得る炎症性疾患は、例えば、敗血性ショック、敗血症、および成人呼吸困難症候群を包含する。標的とされる自己免疫疾患は、例えば、リウマチ、関節炎、全身性エリテマトーデス、硬皮症、慢性甲状腺炎、グレーブス病、自己免疫性胃炎、インスリン依存性真性糖尿病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性好中球減少症、血小板減少症、慢性活動性肝炎、重傷筋無力症および多発性硬化症を包含する。本発明の標的とする神経変性疾患はまた、創傷の治癒を促進するために使用され得る。有害な、アポトーシスに関連する、標的とする疾患、換言すれば虚血性傷害に関連する疾患は、心筋梗塞、卒中、および虚血性腎疾患を包含する。

10

用語「有効量」は、上記状態の処置において使用するための、1日当たり体重1キログラム当たり、約0.05mgから約140mgのオーダーの投薬レベルをいう(1日当たり患者1人当たり約2.5mgから約7g)。例えば、炎症は、1日当たり体重1キログラム当たり約0.01~50mg(1日当たり患者1人当たり約0.5mgから約3.5g)の化合物の投与によって、有効に処置され得る。

キャリア物質と組み合わされて単回投薬形態を生成し得る式1、3の化合物または他のICE/CED-3インヒビターの量は、処置される宿主および特定の投与モードに応じて変化する。例えば、ヒトに経口投与することが意図される処方物は、適切かつ簡便な量の薬学的に受容可能なキャリア(これは組成物全体の約5%から約95%まで変化し得る)と配合された、0.5mg~5gの式1、3または他のICE/ced-3インヒビターの化合物を含み得る。投薬単位形態は、通常、約1mgから約500mgの間の式1、3または他のICE/ced-3インヒビターの活性化化合物を含む。

20

しかし、任意の特定の患者のための特定の「有効量」は、使用される特定の化合物の活性、年齢、体重、全般的な健康状態、性別、食餌、投与の時間、投与経路、排泄速度、薬物の組み合わせ、および治療を受ける特定の疾患の重篤度を包含する種々の因子に依存することが、理解される。

本発明は、本明細書中に開示される化合物をICE/ced-3プロテアーゼを抑制しアポトーシスを防止するために使用することに焦点を当てているが、本発明の化合物はまた、他のシステインプロテアーゼのための阻害剤としても使用され得る。

30

本発明の化合物はまた、システインプロテアーゼのICE/CED-3ファミリーあるいは他のシステインプロテアーゼに効果的に結合する市販試薬として有用である。市販試薬として、本発明の化合物およびその誘導体は、標的ペプチドのタンパク質分解をブロックするために使用され得るか、あるいは誘導体化されて、アフィニティークロマトグラフィー用途のための固定基質として、安定な樹脂に結合され得る。市販のシステインプロテアーゼインヒビターを特徴づける、これらの、および他の使用は、当業者には明白である。

以下の実施例は、本発明を例示することを意図しているが、それらを限定することを意図していない。それらは、使用できるもののうちの典型であるものの、当業者に公知の他の手法を代わりに使用してもよい。

以下の実施例において、プロトンNMRスペクトルは、300MHzで得られた；化学シフトは、内部テトラメチルシランから低磁場に引用される。

40

実施例 1

ICE/ced-3プロテアーゼファミリー活性の阻害についてのアッセイ

A. IC₅₀ 値の決定

組み替えICEおよびCPP32酵素を用いて、本質的に、それぞれ、Thornberryら(*Nature*, 356:768:774(1992))およびNicholsonら(*Nature*, 376:37-43(1995))(本明細書中で参考として援用される)に従って、96ウェルマイクロタイタープレート中で式1の化合物の活性を検出する蛍光酵素アッセイを行った。これらのアッセイについての基質は、ICEアッセイについてアセチル-Tyr-Val-Ala-Asp-アミノ-4-メチルクマリン(AMC)であり、そしてcpp32およびMch5アッセイについてアセチル-Asp-Glu-Val-Asp-アミノ-4-メチルクマリンであっ

50

た。酵素反応は、2mM DTTを含むICE緩衝液(25mM HEPES、1mM EDTA、0.1% CHAPS、10% スクロース、pH 7.5)中で、室温で、2連で行われた。アッセイは、以下の成分を混合することにより行われた。：

8.0(ICE、Mch2、Mch3、CPP32)または20(Mch5)mM DTTのいずれかを含むICE緩衝液中の、50 μ Lの、ICE、Mch2、Mch5、またはcpp32のいずれか（それぞれ18.8、38、8.1および0.153nM濃度）またはMch3(1ユニット)の酵素；

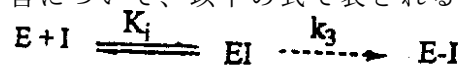
50 μ Lの式1の化合物またはICE緩衝液(コントロール)のいずれか；および100 μ Lの20 μ Mの基質。

アッセイする酵素および式1の化合物をマイクロタータープレートウェル中で30分間室温でプレインキュベートした後、基質を添加して反応を開始した。360nmの励起波長を用いて460nmにおける蛍光発光を測定することにより、蛍光AMC生成物形成を室温で1時間モニターした。2連(コントロール)のウェル中の蛍光変化の平均を計算しそして平均値を、インヒビター濃度の関数としてプロットして、50%阻害を生成するインヒビター濃度(IC_{50})を決定した。結果を表1および4(図1および4)に示す。

このアッセイについての参照化合物は、Cbz-ValAlaAsp-Hであった。これを、表1および4中において「参照(reference)」と呼ぶ。

B. 非可逆的インヒビターについての解離定数 K_i および非可逆的速度定数 k_3 の決定

競合的非可逆的インヒビターによるICE/ced-3ファミリープロテアーゼ酵素の非可逆的阻害について、以下の式で表されるモデルを用いて：



時間tにおける生成物の形成は、以下で表現される：

$$[P]_t = [E]^T \left(\frac{[S]K_i}{[I]K_s} \right) \left(\frac{k_3}{k_3} \right) \left[1 - e^{-k_3 t / (1 + \frac{K_i}{[I]} (1 + \frac{[S]}{K_s}))} \right]$$

等式1

ここでE、I、EI、およびE-Iは、それぞれ、活性酵素、インヒビター、非共有結合酵素-インヒビター複合体および共有結合酵素-インヒビター付加物を示す。 K_i 値は、可逆的結合工程の全体の解離定数である。そして k_3 は、非可逆的速度定数である。 $[S]$ および K_s 値は、それぞれ、酵素に結合した基質の基質濃度および解離定数である。

上記の等式は、ICE/ced-3ファミリープロテアーゼに結合した所定のインヒビターの K_i および k_3 値を決定するために使用される。従って、連続的なアッセイを、60分間、様々な濃度のインヒビターおよび基質で行った。アッセイは、本質的に、表1のデータの生成についての上記と同様に、行われた(formulated)。ただし、反応は、酵素を基質-インヒビター混合物に添加することにより開始された。 K_i および k_3 値を、生成物AMC形成を式1に従う時間の関数としてシミュレーションすることにより得た。この第2のアッセイの結果を、以下の表2、3および5(図2、3および5)に示す。

このアッセイについての参照化合物は、Cbz-ValAlaAsp-CH₂Fであり、そして値は、表2、3および5において「参照(Reference)」として示される。

実施例2

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン

1-メチルインドール-2-カルボン酸(107mg、0.6mmol)および(3S)-3-(アラニニル)-アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(188mg、96%、0.6mmol)を、DMF(2mL)中に溶解し、次いで、1-1ヒドロキシベンゾトリアゾール-水和物(96mg、0.63mmol)および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDAC)(161mg、0.84m

10

20

30

40

50

mol)の両方を、0℃においてチッソ雰囲気下で、得られた混合物に添加した。攪拌を0℃において1時間継続し、そしてさらに20時間室温で継続した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで連続して洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して黄色の固体を得た。エーテルでの固体の粉末化により、表題生成物を、わずかに黄色の粉末(213mg、77%)として得た。TLC:(メタノール/塩化メチレン:1/9、シリカゲル): R_f =0.47; $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD})$: δ 7.96(d、 J =8.0、1H)、7.57-7.67(m、2H)、7.31-7.42(m、2H)、7.13-7.19(m、2H)、7.06(s、1H)、4.91(m、1H)、4.65(q、 J =7.1、1H)、4.01(s、3H)、2.59-2.78(m、 J =5.6、15.7、2H)、1.49(d、 J =7.1、3H)、1.39(s、9H)。

実施例 3

10

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、*t*-ブチルエステルセミカルバゾン(127mg、0.28mmol)を、アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中に懸濁し、そして懸濁液をトリフルオロ酢酸(TFA)(1mL)で処理した。得られた溶液を、窒素雰囲気下、室温で2時間攪拌した。次いで、反応混合物を濃縮して、そして塩化メチレンでチェイス(chase)して紫色の泡状物質を得た。泡状物質をエーテルで粉末化して、表題生成物を紫色の粉末として得た(108mg、97%)。

TLC:(塩化メチレン:メタノール:酢酸、20:1:1、シリカゲル): R_f =0.27; $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 7.62(d、 J =8.0、1H)、7.44(d、 J =8.2、1H)、7.24-7.32(m、2H)、7.07-7.13(m、2H)、4.91(m、1H)、4.56(q、 J =7.1、1H)、3.98(s、3H)、2.78(d、 J =6.5、2H)、1.49(d、 J =7.3、3H)。

20

実施例 4

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン(87mg、0.22mmol)を、メタノール(3mL)、ホルムアルデヒド(1mL、37重量%、aq)および酢酸(1mL)中に溶解し、そして得られた混合物を窒素雰囲気下、室温で4時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、そして酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル溶液を、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮してガラス状の物質を得、これをエーテルで粉末化して、表題生成物を灰色の粉末(24mg、32%)として得た。

30

TLC:(塩化メチレン:メタノール:酢酸、20:1:1、シリカゲル): R_f =0.44; $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 7.62(d、 J =8.0、1H)、7.44(dd、 J =0.8、8.4、1H)、7.26-7.32(m、1H)、7.08-7.13(m、2H)、4.63-4.53(m、2H)、4.31(m、1H)、3.99(s、3H)、2.48-2.73(m、2H)、1.46(7.1、3H)。

実施例 5

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)プロリニル]アミノ-4-オキソ-ブタン酸、*t*-ブチルエステルセミカルバゾン

1-メチルインドール-2-カルボン酸(102mg、0.58mmol)および(3S)-3-(プロリニル)アミノ-4-オキソブタン酸、*t*-ブチルエステルセミカルバゾン(189mg、0.58mmol)を、塩化メチレン(2mL)およびDMF(1mL)中に溶解し、そして4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(71mg、0.58mmol)およびEDAC(155mg、0.81mmol)の両方を、窒素雰囲気下、0℃で混合物に添加した。攪拌を0℃で1時間継続し、そしてさらに室温で2時間継続した。反応混合物を、酢酸エチルおよび5% KHSO_4 溶液の間で分配した。酢酸エチル溶液を、飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して153mgの褐色の泡状物質を得た。泡状物質を、フラッシュクロマトグラフによりシリカゲル上で、2%メタノール-塩化メチレンを溶出液として用いることにより精製し、表題生成物を、明るい褐色の泡状物質(50mg)として得た。

40

TLC(メタノール/塩化メチレン:5/95、シリカゲル): R_f =0.27、 $^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD})$: δ 8.87(bs、1H)、7.63(d、 J =7.7、1H)、7.38-7.50(m、2H)、7.17-7.13(m、1H)、6.85(bs、1H)、4.90-4.81(m、2H)、3.92-3.74(m、5H)、2.78-1.93(m、6H)、1.37(s、9H)。

実施例 6

50

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)プロリニル]アミノ-4-オキソブタン酸セミカルバゾン

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)プロリニル]アミノ-4-オキソブタン酸、*t*-ブチルエステルセミカルバゾン(50mg、0.1mmol)を、アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中に溶解し、そして得られた溶液を、TFA(1mL)で処理した。次いで、この反応混合物を、窒素雰囲気下、室温で1時間攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスして、紫色のフィルムを得た。フィルムを、エーテルで粉末化して、表題生成物を、紫色の粉末(47mg)として得た。

TLC:(塩化メチレン:メタノール:酢酸、20:1:1、シリカゲル): R_f =0.18; $^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$: δ 7.63-6.93(m, 6H)、6.67(bs, 1H)、4.89-4.50(m, 2H)、3.86-3.74(m, 5H)、2.82-2.74(m、2H)、2.40-2.30(m, 1H)、2.15-1.90(m, 3H)。

10

実施例 7(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)プロリニル]アミノ-4-オキソ-ブタン酸

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)プロリニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン(87mg、0.22mmol)を、メタノール(3mL)、ホルムアルデヒド(1mL、37重量%、aq)および酢酸(1mL)中に溶解し、そして得られた混合物を、窒素雰囲気下、室温で4時間攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、水で希釈して、そして酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル溶液を、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して褐色のオイル(22mg)を得、これを、エーテルで粉末化して表題生成物を、明るい褐色の粉末(8mg)として得た。TLC(塩化メチレン:メタノール:酢酸、20:1:1、シリカゲル): R_f =0.2 20

8;MS(EI)、 $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5 + \text{H}^+ = 372$; $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5 - \text{H}^+ = 370$ 。

実施例 8(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキソブタン酸、*t*-ブチルエステルセミカルバゾン

1-メチルインドール-2-カルボン酸(88mg、0.5mmol)および(3S)-3-(バリニル)アミノ-4-オキソブタン酸、*t*-ブチルエステルセミカルバゾン(163mg、0.5mmol)を、DMF(1mL)および塩化メチレン(2mL)中に溶解し、次いで、DMAP(61mg、0.50mmol)およびEDAC(134mg、0.7mmol)の両方を、窒素雰囲気下、0℃で、溶液に添加した。攪拌を0℃で1時間継続し、そしてさらに4時間室温で継続した。反応混合物を、酢酸エチルおよび5% KHSO_4 溶液の間で分配した。酢酸エチル溶液を、連続的に、5% KHSO_4 溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液、およびブライン溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して黄色の泡状物質を得た。泡状物質をエーテルで粉末化して、表題生成物を、わずかに黄色の粉末(203mg、86%)として得た。

30

TLC(メタノール/塩化メチレン:5/95、シリカゲル): R_f =0.17。

実施例 9(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキソブタン酸、*t*-ブチルエステルセミカルバゾン(170mg、0.36mmol)を、アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)に溶解し、そして得られた溶液を、TFA(1mL)で処理した。得られた溶液を3.5時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスして紫色の泡状物質を得た。泡状物質をエーテルで粉末化して、表題生成物を固体の紫色の粉末(133mg、89%)として得た。

40

実施例 10(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキソ-ブタン酸

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン(136mg、0.33mmol)を、メタノール(3mL)、ホルムアルデヒド(1mL、37重量%、aq)および酢酸(1mL)中に溶解し、そして得られた混合物を、5時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、水で希釈し、そして酢酸エチルで抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして真空下

50

で濃縮して紫色の泡状物質を得、これをエーテルで粉末化して、表題生成物を薄い紫色の粉末(40mg、33%)として得た。TLC:(塩化メチレン:メタノール:酢酸、20:1:1、シリカゲル): $R_f=0.36$;MS(EI) $C_{19}H_{23}N_3O_5+H^+=374$; $C_{19}H_{23}N_3O_5-H^+=372$ 。

実施例11

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)ロイシニル]アミノ-4-オキソ-ブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン

1-メチルインドール-2-カルボン酸(70mg、0.4mmol)および3(S)-(ロイシニル)アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(131mg、0.4mmol)を、塩化メチレン(2mL)中に溶解し、そしてDMAP(49mg、0.40mmol)およびEDAC(107mg、0.56mmol)を、窒素雰囲気下、0℃で、溶液に添加した。攪拌を、0℃で1時間継続し、そしてさらに3時間、室温で継続した。反応混合物を、酢酸エチルおよび5% $KHSO_4$ 溶液の間に分配した。酢酸エチル溶液を、連続的に、5% $KHSO_4$ 溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2x)、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして真空中で濃縮して、粗製の固体を得た。固体をエーテルで粉末化して、表題生成物を、白色の粉末(156mg、80%)として得た。TLC(メタノール/塩化メチレン、5/95、シリカゲル): $R_f=0.42$; ^1H -NMR($CDCl_3+CD_3OD$): δ 8.18(s、1H)、7.66-7.11(m、6H)、6.97(s、1H)、6.32(d、J=7.7、1H)、4.95-4.88(m、1H)、4.70-4.62(m、1H)、4.03(s、3H)、2.82-2.56(m、2H)、1.87-1.58(m、3H)、1.38(9H)、1.00(t、J=6.3、6H)。

10

実施例12

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)ロイシニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン

20

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)ロイシニル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(132mg、0.27mmol)を、アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中に溶解し、そして得られた溶液をTFA(1mL)で処理した。得られた溶液を窒素雰囲気下、室温で、3時間攪拌した。反応混合物を真空中で濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスしてピンク色の泡状物質を得た。泡状物質をエーテルで粉末化して、表題生成物を、ピンク色の粉末(108mg、92%)として得た。

TLC(塩化メチレン:メタノール:酢酸、20:1:1、シリカゲル): $R_f=0.22$; ^1H -NMR(CD_3OD): δ 7.62(dt、J=8.0、1.1、1H)、7.45(dd、J=8.5、0.8、1H)、7.32-7.23(m、2H)、7.13-7.08(m、2H)、4.94-4.89(m、1H)、4.64-4.59(m、1H)、3.98(s、3H)、2.78(d、J=6.2、2H)、1.82-1.70(m、3H)、1.02(d、J=6.0、3H)、0.99(d、J=6.3、3H)。

30

実施例13

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)ロイシニル]アミノ-4-オキソ-ブタン酸

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)ロイシニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン(90mg、0.21mmol)を、メタノール(3mL)、ホルムアルデヒド(1mL、37wt%、aq)および酢酸(1mL)中に溶解し、そして得られた溶液を、7時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応混合物を真空中で濃縮し、水で希釈し、そして酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル溶液を、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして真空中で濃縮して、紫色の泡状物質を得、これをエーテルで粉末化して、表題生成物を紫色の粉末(35mg、43%)として得た。TLC:(塩化メチレン:メタノール:酢酸、20:1:1、シリカゲル): $R_f=0.45$;MS(EI) $C_{20}H_{25}N_3O_5$ について; $M+H^+=388$; $M-H^+=386$ 。

40

実施例14

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)フェニルアラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン

1-メチルインドール-2-カルボン酸(72mg、0.41mmol)および3(S)-(フェニルアラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(154mg、0.41mmol)を、塩化メチレン(2mL)中に溶解し、そしてDMAP(53mg、0.43mmol)およびEDAC(109mg、0.57mmol)の両方を、窒素雰囲気下、0℃で、溶液に添加した。攪拌を1時間、0℃で継続し、そしてさらに4時間、室温で継続した。反応混合物を、酢酸エチルおよび5% $KHSO_4$ 溶液の間に分配し、続いて、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して、白色の固体を得た。固体をエ

50

ーテルで粉末化して、表題生成物を白色の粉末(179mg、82%)として得た。TLC(メタノール/塩化メチレン：5/95、シリカゲル)： $R_f=0.44$ 。

実施例15

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)フェニルアラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)フェニルアラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、*t*-ブチルエステルセミカルバゾン(154mg、0.30mmol)を、アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中に溶解し、そして得られた溶液を、TFA(1mL)で処理した。得られた溶液を、4時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、そして塩化メチレンを共沸させて、紫色の固体を得た。固体をエーテルで粉末化して、表題生成物を紫色の粉末(141mg、100%)として得た。TLC：(塩化メチレン：メタノール：酢酸、20:1:1、シリカゲル)： $R_f=0.25$ 。

10

実施例16

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)フェニルアラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)フェニル-アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン(116mg、0.25mmol)を、メタノール(3mL)、ホルムアルデヒド(1mL、37重量%、aq)および酢酸(1mL)中に溶解し、そして得られた溶液を、9時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、水で希釈し、そして酢酸エチルで2回抽出した。酢酸エチル溶液を、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して粗製生成物を得、これをエーテルで粉末化して、表題生成物を、褐色の粉末(26mg、25%)として得た。TLC(塩化メチレン：メタノール：酢酸、20:1:1、シリカゲル)： $R_f=0.33$ ；MS(EI) $C_{23}H_{21}N_3O_5$ について； $M+H^+=422$ ； $M-H^+=420$ 。

20

実施例17

(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシン、メチルエステル

DMAP(1.222g、0.01mol)およびEDAC(2.680g、0.014mol)を、固体として、塩化メチレン(30mL)およびDMF(5mL)中の1-メチルインドール-2-カルボン酸(1.752g、0.01mol)およびグリシンメチルエステル塩酸塩(1.256g、0.01mol)に、窒素雰囲気下、0℃で、溶液に添加した。攪拌を0℃で1時間継続し、次いで3時間、室温で継続した。反応混合物を、酢酸エチルおよび5% $KHSO_4$ 溶液の間で分配し、そして水層を酢酸エチルで抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、5% $KHSO_4$ 溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2x)溶液、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して、粗製生成物として、紫色の粉末を得た。粉末をエーテルで粉末化(trituration)して、表題生成物(1.734mg、70%)を得た。TLC(メタノール/塩化メチレン1:9)： $R_f=0.61$ ； ^1H -NMR($CDCl_3$)： δ 7.65(dt, $J=8.0$ 、1.1, 1H)、7.41-7.31(m, 2H)、7.16(dd, $J=6.6$ 、1.4, 1H)、6.96(d, $J=0.5$, 1H)、6.67(bs, 1H)、4.25(d, $J=5.2$, 2H)、4.05(s, 3H)、3.82(s, 3H)。

30

実施例18

(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシン

(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシンメチルエステル(1.687g、6.85mmol)を、1,4-ジオキサン(10mL)中に溶解し、そして攪拌しながら、1N水酸化リチウム(7.0mL、aq)で処理した。反応混合物は、直ちに、透明になり、そして1N HClで酸性化し、そして濃縮して1,4-ジオキサンを除去し、その結果、紫色の沈殿が得られた。沈殿を濾過し、水で洗浄し、そして真空下で乾燥して表題生成物を紫色の粉末(1.482g、93%)として得た。TLC：(塩化メチレン：メタノール：酢酸、20:1:1、シリカゲル)： $R_f=0.28$ ； ^1H -NMR(CD_3OD)： δ 7.61(dt, $J=8.2$, 1H)、7.44(dd, $J=8.5$, 0.8, 1H)、7.32-7.26(m, 1H)、7.13-7.09(m, 1H)、7.04(s, 1H)、4.08(s, 2H)、3.99(s, 3H)。

40

実施例19

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシン]アミノ-4-オキソ-ブタン酸、*t*-ブチルエステル、セミカルバゾン

(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシン(186mg、0.8mmol)を、塩化メチレン(5mL)お

50

よびDMF(1mL)中に溶解し、そして得られた溶液を、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(129mg、0.84mmol)およびEDAC(215mg、1.12mmol)で、窒素雰囲気下で処理し、そして反応混合物を0℃で10分間攪拌した。3(S)-アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾンp-トルエンスルフェート(312mg、0.8mmol)、次いでN-メチルモルホリン(0.09mL、0.8mmol)を、反応混合物に添加し、そして混合物を、1時間、0℃で攪拌し、そして室温でさらに4時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルおよび5% KHSO₄の間で分配し、そして後処理の間に生成物が沈殿した。水性部分からの白色沈殿を濾過により得て、そして水およびエーテルで洗浄した。有機相を濃縮し、そして残渣をエーテルで粉末化することにより白色沈殿物の別の部分を得た。合わせた沈殿物は、表題生成物(297mg、66%)であった。TLC(メタノール/塩化メチレン：1/9、シリカゲル)：R_f=0.42；¹H-NMR(CDCl₃) δ 7.65(d, J=8.0, 1H)、7.41-7.34(m, 2H)、7.19-7.13(m, 2H)、7.05(d, J=0.5, 1H)、4.95-4.93(m, 1H)、4.08(s, 2H)、4.03(s, 3H)、2.79-2.59(m, 2H)、1.41(s, 9H)。

10

実施例20

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシニル]アミノ-4-オキソ-ブタン酸、セミカルバゾン

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシニル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(118mg、0.26mmol)を、アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中に溶解し、そして得られた溶液をTFA(1mL)で処理した。得られた溶液を、3時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、そしておよび塩化メチレンでチェイスして、緑色の固体を得た。エーテルでの固体の粉末化により、表題生成物を緑色の粉末(88mg、87%)として得た。

20

TLC：(塩化メチレン：メタノール：酢酸、20:1:1、シリカゲル)：R_f=0.47；¹H-NMR(CD₃OD)：δ 7.63-7.08(m, 6H)、4.95(m, 1H)、4.05(s, 2H)、4.01(s, 3H)、3.77(d, J=5.8, 2H)。

実施例21

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシニル]-アミノ-4-オキソブタン酸

(3S)-3-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)グリシニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン(76mg、0.20mmol)を、メタノール(3mL)、ホルムアルデヒド(1mL、37重量%、aq)および酢酸(1mL)の混合物中に溶解し、そして混合物を、6時間、窒素雰囲気下、室温で攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、水で希釈し、酢酸エチルで2回抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、ブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して、粗製生成物を得、これをエーテルで粉末化して、表題生成物を、明るい黄色の粉末(29mg、44%)として得た。TLC(塩化メチレン：メタノール：酢酸、8:1:1、シリカゲル)：R_f=0.61；MS(EI) C₁₆H₁₇N₃O₅について：M+H⁺ 330。¹H-NMR(CD₃OD)：δ 7.73-7.08(m, 5H)、4.90-3.8(m, 7H)、2.72-2.47(m, 2H)。

30

実施例22

(3S)-3-[(1-ベンジルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン

1-ベンジルインドール-2-カルボン酸(477mg、1.9mmol)および3(S)-(アラニニル)アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(581mg、1.9mmol)を、塩化メチレン(8mL)中に溶解し、そしてDMAP(232mg、1.9mmol)およびEDAC(498mg、2.6mmol)の両方を、窒素雰囲気下、0℃で溶液に添加した。得られた溶液を、0℃で1時間攪拌し、そしてさらに2時間室温で攪拌した。次いで反応混合物を、酢酸エチルで希釈し、連続的に飽和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して黄色の泡状物質を得た。泡状物質を、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製(シリカゲル、メタノール/塩化メチレン2-5%)して、表題生成物を白色の粉末(570mg、56%)として得た。TLC(メタノール/塩化メチレン：1/9、シリカゲル)：R_f=0.38；¹H-NMR(CDCl₃)：δ 8.60(bs, 1H)、7.67(dd, J=8.0, 1.1, 1H)、7.50(d, J=8.0, 1H)、7.33-7.01(m, 8H)、6.79(d, J=7.4, 1H)、5.78(s, 2H)、4.87-4.83(m, 1H)、4.67-4.62(m, 1H)、2.73-2.43(m, 2H)、1.46(d, J=7.1, 3H)、1.39(s, 9H)。

40

実施例23

50

(3S)-3-[(1-ベンジルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキシブタン酸、
セミカルバゾン

(3S)-3-[(1-ベンジルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキシブタン酸、
t-ブチルエステルセミカルバゾン(247mg, 0.46mmol)を、アニソール(0.5mL)および塩化メ
チレン(2 mL)に溶解し、そして得られた混合物をTFA(1 mL)で処理した。得られた溶液を
、窒素雰囲気下、室温にて3.5時間撹拌した。反応混合物を濃縮し、そして塩化メチレン
でチェイスし、明るい緑色の固体を得た。この固体をエーテルで粉末化し、表題生成物を
緑色の粉末(215mg, 98%)として得た。TLC：(塩化メチレン：メタノール：酢酸、8：1
：1、シリカゲル)： $R_f=0.50$ ； $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ ： δ 8.26(d, $J=8.0$, 1H), 7.65(d, $J=8.0$,
1H), 7.36(dd, $J=8.5$, 0.8, 1H), 7.26-7.01(m, 8H), 5.79(d, $J=7.4$, 1H), 4.56-4.49(
m, 1H), 2.77-2.62(m, 2H), 1.43(d, $J=7.4$, 3H)。

実施例24

(3S)-3-[(1-ベンジルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキシブタン酸

(3S)-3-[(1-ベンジルインドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキシブタン酸、
セミカルバゾン(176mg, 0.37mmol)を、メタノール(4.5mL)、ホルムアルデヒド(1.5mL, 37
重量%水溶液)、および酢酸(1.5mL)に溶解し、そして得られた混合物を、窒素雰囲気下、
室温にて4時間撹拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、水で希釈し、そして酢酸エチル
で2度抽出した。酢酸エチル溶液をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして
濃縮し、粗生成物を得た。これを、エーテルで粉末化し、表題生成物を緑色の粉末(113mg
, 72%)として得た。TLC：(塩化メチレン：メタノール：酢酸、20：1：1、シリカゲル)
： $R_f=0.38$ ； $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_5$ に関するMS； $M+H^+=422$ ； $M-H^+=420$ 。 $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ ： δ 7
.65(d, $J=8.0$, 1H), 7.37(dd, $J=8.2$, 1H), 7.24-7.04(m, 8H), 5.87-5.73(m, 2H), 4.60
-4.49(m, 2H), 4.32-4.23(m, 1H), 2.69-2.44(m, 2H), 1.41(d, $J=7.1$, 2セット, 3H)。

実施例25

(3S)-3-[(1-(4'-ブテニル)インドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキシブタン酸
、t-ブチルエステルセミカルバゾン

[1-(4'-ブテニル)インドール]-2-カルボン酸(108mg, 0.5mmol)および3(S)-(バリニル)ア
ミノ-4-オキシブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(163mg, 0.5mmol)を、塩化メ
チレン(3mL)に溶解した。この溶液に、DMAP(61mg, 0.5mmol)およびEDAC(134mg, 0.7mmol)
の両方を、窒素雰囲気下、温度0℃にて添加し、そして得られた反応混合物を1時間0℃
で撹拌し、さらに室温で5時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、連続的に飽
和重炭酸ナトリウム溶液およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮
し、黄色泡状物質を得た。この泡状物質をエーテルで粉末化し、表題生成物をわずかに黄
色の粉末(146mg, 55%)として得た。TLC：(メタノール／塩化メチレン：1/9、シリカゲ
ル)： $R_f=0.23$ ； $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ ： δ 8.69(bs, 1H), 7.64(d, $J=8.0$, 1H), 7.41-7.13(m,
3H), 6.99(s, 1H), 6.91(d, $J=8.8$, 1H), 5.85-5.71(m, 1H), 5.04-4.94(m, 3H), 4.65-
4.45(m, 3H), 3.52-2.50(m, 4H), 2.33-2.26(m, 1H), 1.41(s, 9H), 1.05-1.02(m, 6H)。

実施例26

(3S)-3-[(1-(4'-ブテニル)インドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキシブタン酸
、セミカルバゾン

(3S)-3-[(1-(4'-ブテニル)インドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキシブタン酸
、t-ブチルエステルセミカルバゾン(247mg, 0.46mmol)を、アニソール(0.2mL)および塩化
メチレン(2 mL)に溶解し、そして得られた溶液をTFA(1 mL)で処理した。酸性化溶液混合
物を、窒素雰囲気下、室温にて4時間撹拌した。反応混合物を濃縮し、そして塩化メチレ
ンでチェイスし、粗製固体を得た。この固体をエーテルで粉末化し、表題生成物を紫色の
粉末(99mg, 88%)として得た。TLC：(塩化メチレン：メタノール：酢酸、20：1：1、
シリカゲル)： $R_f=0.36$ ； $^1\text{H NMR}(\text{CD}_3\text{OD})$ ： δ 8.46(d, $J=8.0$, 1H), 8.12(d, $J=8.2$, 1H)
, 7.62(d, $J=8.0$, 1H), 7.46(dd, $J=8.5$, 0.8, 1H), 7.31-7.21(m, 2H), 7.31-7.05(m, 2
H), 5.84-5.70(m, 1H), 4.99-4.78(m, 3H), 4.62-4.57(m, 2H), 4.39-4.33(m, 1H), 2.88
-2.69(m, 2H), 2.52-2.45(m, 2H), 2.24-2.15(m, 1H), 1.07-1.02(m, 6H)。

実施例27

(3S)-3-[(1-(4'-ブテニル)インドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキソブタン酸
 (3S)-3-[(1-(4'-ブテニル)インドール-2-カルボニル)バリニル]アミノ-4-オキソブタン酸、
 セミカルバゾン(79mg, 0.17mmol)を、メタノール(3 mL)、ホルムアルデヒド(1 mL, 37
 重量%水溶液)および酢酸(1 mL)に溶解し、そして得られた混合物を、窒素雰囲気下、室
 温にて7時間攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、水で希釈し、そして酢酸エチルで
 2度抽出した。合わせた酢酸エチル溶液をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、
 そして濃縮し、粗生成物を得た。これをエーテルで粉末化し、表題生成物を明るい紫色の
 粉末(24mg, 34%)として得た。TLC: (塩化メチレン:メタノール:酢酸、20:1:1、
 シリカゲル): $R_f = 0.60$; $C_{22}H_{27}N_3O_5$ に関するMS(EI): $M+H^+ = 414$; $M-H^+ = 412$. ^1H NMR(CD_3OD): δ 8.09-8.05(m, 1H), 7.62(d, $J=8.0$, 1H), 7.46(dd, $J=8.5$, 0.8, 1H), 7.3
 1-7.25(m, 1H), 7.13-7.07(m, 2H), 5.85-5.71(m, 1H), 4.99-4.90(m, 3H), 4.62-4.54(m
 , 3H), 4.41-4.30(m, 2H), 2.75-2.46(m, 4H), 2.22-2.14(m, 1H), 1.06-1.02(m, 6H)。

10

実施例28

(3S)-3-[(1-(2'-(1'-t-ブトキシ-1'-オキシ)エチル)インドール-2-カルボニル)アラニニ
 ル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン
 1-[2'-(1'-t-ブトキシ-1'-オキシ)エチル]インドール-2-カルボン酸(220mg, 0.8mmol)お
 よび3(S)-(アラニニル)アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(241
 mg, 0.8mmol)を、塩化メチレン(3 mL)およびDMF(1 mL)に溶解し、そして得られた溶液を
 、DMAP(98mg, 0.8mmol)およびEDAC(211mg, 1.0mmol)の両方で処理した。得られた反応混
 合物を、0℃で1時間攪拌し、次いでさらに室温で3時間攪拌し、白色の沈殿物を得た。
 反応混合物を濃縮し、塩化メチレンを除去し、そして5% $KHSO_4$ 溶液でクエンチした。白
 色固体を濾過によって回収し、水およびエーテルで洗浄し、そして真空下で乾燥し、表題
 生成物を白色の粉末(297mg, 66%)として得た。TLC: (メタノール/塩化メチレン/:1/
 9、シリカゲル): $R_f = 0.27$. ^1H NMR(CD_3OD): δ 7.65(d, $J=8.0$, 1H), 7.26(s, 1H), 7
 .22(d, $J=3.0$, 1H), 7.16-7.11(m, 1H), 5.32(d, $J=2.2$, 2H), 4.94-4.89(m, 1H), 4.54(
 q, $J=7.1$, 1H), 2.76(d, 2H), 1.48(d, $J=7.4$, 3H)。

20

実施例29

(3S)-3-[(1-カルボキシメチル)-インドール-2-カルボニル]アラニニル]アミノ-4-オキシ
 ブタン酸、セミカルバゾン
 塩化メチレン(2 mL)中の(3S)-3-[(1-(2'-(1'-t-ブトキシ-1'-オキシ)エチル)インドール-
 2-カルボニル)]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン(274mg, 0.51mmol)を、TFA(1
 mL)で処理した。得られた溶液を、室温、窒素雰囲気下で2時間攪拌した。反応混合物を
 濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスし、固体を得た。この固体をエーテルで粉末化し
 、表題生成物を明るい灰色の粉末(262mg)として得た。TLC: (塩化メチレン:メタノール
 :酢酸、8:1:1、シリカゲル): $R_f = 0.08$. ^1H NMR(CD_3OD): δ 7.65(d, $J=8.0$, 1H)
 , 7.41(d, $J=8.0$, 1H), 7.26(s, 1H), 7.22(d, $J=3.0$, 1H), 7.16-7.11(m, 1H), 5.32(d,
 $J=2.2$, 2H), 4.94-4.89(m, 1H), 4.54(q, $J=7.1$, 1H), 2.76(d, 2H), 1.48(d, $J=7.4$, 3
 H)。

30

実施例30

(3S)-3-[(1-カルボキシメチル)インドール-2-カルボニル]アラニニル]アミノ-4-オキソ
 ブタン酸
 (3S)-3-[(1-(カルボキシメチル)インドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキシ
 ブタン酸、セミカルバゾン(241mg, 0.47mmol)を、メタノール(3 mL)、ホルムアルデヒド(
 1 mL, 37%水溶液)および酢酸(1 mL)に溶解し、そして得られた溶液を、室温、窒素雰
 囲気下で3時間攪拌した。反応混合物を真空下で濃縮し、水で希釈し、そして酢酸エチルで
 2度抽出した。合わせた酢酸エチル溶液をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、
 そして濃縮し、ガラス状物質を得た。このガラス状物質をエーテルで粉末化し、表題生
 成物をわずかに黄色の粉末(114mg, 63%)として得た。TLC: (塩化メチレン:メタノール:
 酢酸、8:1:1、シリカゲル): $R_f = 0.16$. ^1H NMR(CD_3OD): δ 7.65(d, $J=8.0$, 1H),

40

50

7.40(d, J=8.2, 1H), 7.33-7.27(m, 1H), 7.24(s, 1H), 7.16-7.10(m, 1H), 5.36および5.26(AB, J=17.9, 2H), 4.64-4.50(m, 2H), 4.34-4.20(m, 1H), 2.72-2.48(m, 2H), 1.45(d, J=7.14, 2H, 2セット)。

実施例31

(3S)-3-[(1-(3'-(1'-t-ブトキシ-1'-オキシ)プロピル)インドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン

1-[3'-(1'-t-ブトキシ-1'-オキシ)プロピル]インドール-2-カルボン酸(147mg, 0.51mmol)を、DMF(3 mL)に溶解し、そして得られた溶液に、DMAP(68mg, 0.56mmol)およびEDAC(140mg, 0.73mmol)の両方を添加した。攪拌を、窒素雰囲気下、0℃で10分間続けた。(3S)-3-(アラニニル)アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(154mg, 0.51mmol)を、この反応混合物に添加し、そして混合物を0℃で1時間攪拌し、次いでさらに室温で4時間攪拌した。反応混合物を、5%KHSO₄溶液と酢酸エチルとの間に分配した。酢酸エチル溶液を5%KHSO₄溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2×)、およびブラインで連続的に洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、粗生成物として泡状物質を得た。この泡状物質をエーテルで粉末化し、表題生成物を白色の粉末(161mg, 55%)として得た。TLC：(メタノール/塩化メチレン/：1/9、シリカゲル)：R_f=0.36；¹H NMR(CD₃OD)：δ 7.62(d, J=8.0, 1H), 7.50(d, J=8.2, 1H), 7.29(t, J=8.2, 1H), 7.22(d, J=3.0, 1H), 7.16(s, 1H), 7.11(t, J=7.4, 1H), 4.96-4.90(m, 2H), 4.82-4.72(m, 2H), 4.56(q, J=7.1, 1H), 2.78-2.66(m, 4H), 1.49(d, J=7.4, 3H), 1.40(s, 9H), 1.28(s, 9H)。

実施例32

(3S)-3-[(1-(2'-カルボキシエチル)インドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン

(3S)-3-[(1-(3'-(1'-t-ブトキシ-1'-オキシ)プロピル)インドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、t-ブチルエステルセミカルバゾン(140mg, 0.24mmol)を、アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2 mL)に溶解し、そしてこの懸濁液をTFA(1 mL)で処理した。得られた溶液を、窒素雰囲気下、室温で2時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスし、固体を得た。この固体をエーテルで粉末化し、表題生成物を無色の粉末(107mg, 95%)として得た。TLC：(塩化メチレン：メタノール：酢酸、8：1：1、シリカゲル)：R_f=0.17；¹H NMR(CD₃OD)：δ 7.62(d, J=8.0, 1H), 7.50(d, J=8.2, 1H), 7.32-7.27(m, 1H), 7.23(d, J=3.0, 1H), 7.13-7.08(m, 2H), 4.97-4.90(m, 1H), 4.80-4.69(m, 1H), 4.54(q, J=7.1, 1H), 2.82-2.73(m, 4H), 1.49(d, J=7.1, 3H)。

実施例33

(3S)-3-[(1-(2'-カルボキシエチル)インドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸

(3S)-3-[(1-(カルボキシエチル)インドール-2-カルボニル)アラニニル]アミノ-4-オキソブタン酸、セミカルバゾン(95mg, 0.21mmol)を、メタノール(3 mL)、ホルムアルデヒド(1 mL, 37%水溶液)および酢酸(1 mL)に溶解し、そして得られた溶液を、室温、窒素雰囲気下で4時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、メタノールを除去し、水で希釈し、そして酢酸エチルで2度抽出した。合わせた酢酸エチル溶液をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、ガラス状物質を得た。このガラス状物質をエーテルで粉末化し、表題生成物をわずかに黄色の粉末(20mg, 20%)として得た。TLC：(塩化メチレン：メタノール：酢酸、8：1：1、シリカゲル)：R_f=0.26。¹H NMR(CD₃OD)：δ 7.62(d, J=8.0, 1H), 7.51(d, J=1H), 7.32-7.27(m, 1H), 7.13-7.08(m, 2H), 4.80-4.76(m, 2H), 4.68-4.52(m, 2H), 4.37-4.25(m, 1H), 2.84-2.50(m, 3H), 1.47(d, J=7.1, 3H, 2セット)。

実施例34

2,6-ジクロロベンジルオキシエタノール

水酸化ナトリウム(1.76g, 0.044mol, 鉍油中60重量%)を、乾燥THF(100mL)中のエチレン

10

20

30

40

50

グリコール(11.2mL)の溶液にゆっくりと添加した。得られた混合物を、窒素雰囲気下、室温で短時間攪拌した。 α -ブromo-2,6-ジクロロトルエン(9.894g, 0.04mol)をこの混合物に添加し、そして混合物をさらに窒素雰囲気下、室温で5.5時間攪拌した。さらなる水酸化ナトリウム(0.400g)を添加し、次いで混合物を室温で24時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、THFを除去し、そして残渣をエーテルと水との間に分配した。水層をエーテル(2×)で逆抽出した。合わせた有機溶液を水およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、濾過し、そして濃縮し、粗製オイルを得た。このオイルを、酢酸エチル/ヘキサン(10-50%)を用いて、シリカゲル上でフラッシュクロマトグラフし、表題生成物を黄色オイル(4.56g, 51%)として得た。TLC: (酢酸エチル/ヘキサン, 30/70) : R_f = 0.26. ^1H NMR(CDCl_3) : δ 7.35-7.18(m, 3H), 4.84(s, 2H), 3.76-3.66(m, 4H).

10

実施例35

5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)-4-ヒドロキシ-3-ニトロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMSOを、塩化オキサリル(7.5mL, 15.0mmol, 塩化メチレン中2.0M)溶液(47.5mL)に滴下し、そして得られた反応混合物を-78°Cで10時間攪拌した。乾燥塩化メチレン(5 mL)中の2,6-ジクロロベンジルオキシ-エタノール(2211mg, 10mmol)を、この混合物に滴下し、次いで、この混合物を窒素雰囲気下、-78°Cで15時間攪拌した。トリエチルアミン(8.4mL, 60mmol)を反応混合物に滴下し、そして得られた混合物を-78°Cで10時間攪拌し、次いで0°Cに加熱した(約20分間にわたって)。tert-ブチル 3-ニトロプロピオネート(1927mg, 乾燥塩化メチレン(5 mL)中11.0mmol)の塩化メチレン溶液を、反応混合物に滴下し、そして混合物を1時間攪拌した。残渣をエーテルで抽出し、そして得られた白色固体を濾過によって回収した。有機濾液を5% KHSO_4 溶液(2×)およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、粗製オイル(3.95g)を得た。オイルを、酢酸エチル/ヘキサン(1:2)を用いるシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにかけ、表題生成物を黄色オイル(2.917g, 74%)として得た。TLC: (酢酸エチル、ヘキサン, 60/40) : R_f = 0.54.

20

実施例36

3-アミノ-5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)-4-ヒドロキシペンタン酸、t-ブチルエステル

メタノール(150mL)中の5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)-4-ヒドロキシ-3-ニトロペンタン酸 t-ブチルエステル(2.213g, 0.0056mol)および湿潤ラネーニッケル(3.4g)を、水素バルーン下、室温で2時間攪拌した。反応混合物をCeliteを通して濾過し、そして濾過ケーキをメタノールで洗浄した。濾液を濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスし、表題生成物(2.078g, 100%)を得た。TLC: (メタノール: 塩化メチレン, 1/9) : R_f = 0.21.

30

実施例37

N-(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリン

DMAP(367mg, 3.0mmol)およびEDAC(748mg, 3.9mmol)を、固体として、DMF(5 mL)中の1,3-ジメチルインドール-2-カルボン酸(568mg, 3.3mmol)の溶液に添加し、そして得られた混合物を窒素雰囲気下、0°Cで10時間攪拌した。バリンのメチルエステルの塩化メチレン溶液(553mg, 3.3mmol, 5 mLの塩化メチレン中)をこの混合物に添加し、そして混合物をまず0°Cで1時間攪拌し、次いで室温で5時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルと5% KHSO_4 溶液との間に分配し、そして水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチルを、順に、5% KHSO_4 溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2×)、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、表題生成物を黄色シロップ(900mg)として得た。

40

上記黄色シロップの1,4-ジオキサン溶液(5 mL)を、水酸化リチウム(1.0M LiOH, 3.0mL)の水溶液で処理し、そして得られた混合物を室温で1時間攪拌した。(混合物が均一になった)。反応混合物を1M塩酸で酸性化し、そして酢酸エチル(3×)で抽出した。合わせた酢酸エチル溶液をブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、表題生成物を黄色泡状物質(839mg)として得た。 ^1H NMR(CD_3OD) : δ 7.58(d, J=8.0, 0.8, 1H), 7.37(dd, J=8.0, 1H), 7.29-7.24(m, 1H), 7.12-7.06(m, 1H), 4.57(d, J=5.8, 1H), 3.80

50

(s, 3H), 2.48(s, 3H), 3.34-2.28(m, 1H), 1.10(d, J=6.9, 3H), 1.07(d, J=6.9, 3H)。

実施例38

N-[(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)ペンタン酸、t-ブチルエステル

1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(153mg, 1.0mmol)およびEDAC(268mg, 1.4mmol)を、N-(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリン(塩化メチレン 3 mL中、288mg, 1.0mmol)の塩化メチレン溶液に添加した。得られた混合物を窒素雰囲気下、室温にて10分間撹拌した。3-アミノ-5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)-4-ヒドロキシペンタン酸、t-ブチルエステル(塩化メチレン 2 mL中、364mg, 1.0mmol)の塩化メチレン溶液を、反応混合物に添加し、そして混合物をまず1時間室温 0 °Cにて撹拌し、次いで室温で16時間撹拌した。10
反応混合物を酢酸エチルと5 % KHSO₄溶液との間に分配し、そして水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチルを、5 % KHSO₄溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2 ×)、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、表題生成物を(583 mg)を得た。この粗生成物を酢酸エチル/ヘキサン(2/3)を用いるシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーにかけ、表題生成物を白色固体(260mg)として得た。TLC: (酢酸エチル/ヘキサン1:1) : R_f=0.38。

実施例39

N-[(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)ペンタン酸、t-ブチルエステル

Dess-Martinペルヨージナン(195mg)を、固体として、DMSO(1.5ml)中のn-[(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリン]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)ペンタン酸、t-ブチルエステル(96mg)の溶液に添加した。得られた溶液を、窒素
20 雰囲気下、室温にて30分間撹拌し、次いで、EtOAcと水との間に分配した。有機相を水(2 ×)およびブラインで洗浄し、乾燥し(Na₂SO₄)、そして濃縮し、白色固体(83mg)を得た。EtOAc/ヘキサン(1:1)によるフラッシュクロマトグラフィーで精製し、表題生成物を白色固体(54mg)として得た。TLC(EtOAc/ヘキサン; 1:1、シリカゲル) : R_f=0.52。

実施例40

N-[(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)ペンタン酸

アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2 mL)中のN-[(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリン]-3-アミノ-4-オキソ-5-(2',6'-ジクロロベンジルオキシ)ペンタン酸、t-ブチルエステル(49mg)の溶液を、TFA (1 mL)で処理し、そして、窒素雰囲気下、室温にて30
30 分間撹拌した。得られた溶液を濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスし、白色固体を粗生成物として得た。この粗生成物をエーテルで粉末化し、表題生成物を白色粉末(34mg)として得た。C₂₈H₃₁Cl₂N₃O₆に関するMS(EI); MH⁺=576/578; (MH)=574/576。

実施例41

N-[(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(67mg, 0.55mmol)および1-(3'-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(EDAC)(125mg, 0.65mmol)を、固体として、1,3-ジメチルインドール-2-カルボン酸(DMF 1 mL中、95mg, 0.5mmol)のDMF溶液に添加し、そして得られた反応混合物を、窒素雰囲気下、0 °Cで10分間撹拌した。N-(バリニル)-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(塩化メチレン 1 mL中、153mg, 0.5mmol)の塩化メチレン溶液を、添加し、そして得られた反応混合物をまず0 °Cで1時間撹拌し、次いで室温で4時間撹拌した。反応混合物を酢酸エチルと5 % KHSO₄溶液との間に分配し、そして水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、5 % KHSO₄溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2 ×)、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、固体を得た。この固体をエーテル/ヘキサンで粉末化し、表
40 題生成物を白色固体(134mg, 56%)として得た。TLC: (酢酸エチル/ヘキサン2:1) : R_f=0.42。 ¹H NMR(CDCl₃): δ 7.59(d, J=8.8, 1H), 7.37(d, J=7.7, 1H), 7.29-7.24(m, 1H
50

), 7.12-7.07(m, 1H), 4.49-4.26(m, 5H), 3.81-3.79(m, 3H), 2.66-2.47(m, 5H), 2.22-2.10(m, 1H), 1.45-1.41(m, 9H), 1.09-1.03(m, 6H)。

実施例42

N-[(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

ジメチルスルホキシド(0.09mL, 1.25mmol)を、塩化メチレン(4 mL)中の塩化オキサリル(0.19mL, 2.0m, 0.38mmol)の溶液に添加し、そして得られた混合物を、窒素雰囲気下、-78℃で10分間攪拌した。N-[1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(119mg, 乾燥塩化メチレン 1 mL中0.25mmol)の乾燥塩化メチレン溶液を、この混合物に滴下し、そして得られた反応混合物を-78℃で15分間攪拌した。トリエチルアミン(0.2mL, 1.5mmol)を滴下し、次いで反応混合物を-78℃で10分間攪拌し、次いで室温に加温した。反応混合物を酢酸エチルと5% KHSO₄溶液との間に分配し、そして水層を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、5% KHSO₄溶液およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、粗生成物を得た。この粗生成物を酢酸エチル/ヘキサン(2:1)でシリカゲル上でクロマトグラフし、表題生成物を白色固体(48mg, 41%)として得た。TLC: (酢酸エチル/ヘキサン2:1): R_f=0.58。

10

実施例43

N-[(1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

20

アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2 mL)中のN-[1,3-ジメチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(40mg)を、トリフルオロ酢酸(1 mL)で処理し、そして得られた反応混合物を、窒素雰囲気下、室温にて30分間攪拌した。この反応混合物を濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスし、固体を得た。この固体をエーテルで粉末化し、表題生成物を褐色粉末(17mg)として得た。TLC: (塩化メチル/メタノール/酢酸20:1:1): R_f=0.40。C₂₁H₂₆FN₃O₅に関するMS(EI): MH⁺=420; MH⁻=418。

実施例44

N-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

30

DMAP(95mg, 0.78mmol)およびEDAC(200mg, 1.04mmol)を、固体として、塩化メチレン(5 mL)中の1-メチルインドール-2-カルボン酸(130mg, 0.74mmol)およびN-(バリニル)-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(227mg, 0.74mmol)の溶液に添加し、そして得られた混合物を窒素雰囲気下、0℃で1時間攪拌し、次いで室温で4時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルと5% KHSO₄溶液との間に分配し、そして水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチルを、5% KHSO₄溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(2×)、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、泡状物質を得た。この泡状物質をエーテルで粉末化し、表題生成物をわずかに褐色固体(224mg, 65%)として得た。TLC: (メタノール/塩化メチレン、1:9): R_f=0.46。

実施例45

40

N-[(3-クロロ-1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMSO(0.06mL, 0.9mmol)を、塩化オキサリル溶液(0.14mL, 2.0M, 0.28mmol, 塩化メチレン 4 mL中)に添加し、次いでこの溶液を、窒素雰囲気下、-78℃で10分間攪拌した。乾燥塩化メチレン(1 mL)中のN-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(85mg, 0.18mmol)の溶液をこの反応混合物に滴下し、そしてこの混合物を-78℃で15分間攪拌した。トリエチルアミン(0.15mL, 1.08mmol)を反応混合物に滴下し、そして混合物を-78℃で10分間攪拌し、次いで室温まで加温した。反応混合物を酢酸エチルと5% KHSO₄溶液との間に分配し、そして水層を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、5% KHSO₄溶液およびブラインで洗浄

50

し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮し、褐色泡状物質を得た。この泡状物質をエーテルで粉末化し、表題生成物を明るい褐色の粉末(64mg)として得た。 $C_{24}H_{31}ClFN_3O_5$ に関するMS: (MH)⁺=494/496。

実施例46

N-[(3-クロロ-1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中のN-[(3-クロロ-1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(47mg)の溶液を、TFA(1mL)で処理し、得られた反応混合物を、窒素雰囲気下、室温で1時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、塩化メチレンでチェイスし(chase)、次いで、エーテルで粉末化し、茶色粉末(28mg)を得た。この粉末を、1滴の酢酸を含有するメタノール/塩化メチレンを用いて、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーに供し、表題化合物(25mg)を得た。TLC(塩化メチレン/メタノール、9:1):R_f=0.29。 $C_{20}H_{23}ClFN_3O_5$ についてのMS: MH⁺=440.442; (M-H)⁻=438/440。

10

実施例47

N-[(5-フロオロ-1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMAP(257mg、2.08mmol)およびEDAC(427mg、2.23mmol)を、固体として、5-フルオロ-1-メチルインドール-2-カルボン酸(3mLのDMF中、359mg、86mmol)の溶液に加え、得られた反応混合物を窒素雰囲気下、0℃で10分間攪拌した。DMF(3mL)中のN-(バリニル)-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(579mg、1.86mmol)を加え、得られた溶液を窒素雰囲気下、0℃で1時間および室温で4時間攪拌した。反応混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配し、水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、5%KHSO₄溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(×2)およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して表題生成物をわずかに黄色の固体(0.827mg)として得た。TLC(メタノール/塩化メチレン、1:9):R_f=0.52。

20

実施例48

N-[(3-クロロ-5-フルオロ-1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMSO(0.60mL、8.5mmol)を、塩化オキサリル(15mLの塩化メチレン中、2.1mL、2.0M、4.2mmol)の塩化メチレン溶液に加え、得られた反応混合物を窒素雰囲気下、-78℃で10分間攪拌した。N-[(5-フルオロ-1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(8mLの乾燥塩化メチレン中、820mg、1.7mmol)の塩化メチレン溶液、およびDMSO(0.4mL)を反応混合物に滴下し、-78℃で15分間攪拌した。TEA(1.4mL、10.2mmol)を混合物に滴下し、混合物を-78℃で10分間攪拌し、次いで、室温まで加温した。反応混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配し、水層を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を5%KHSO₄溶液およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して表題生成物をわずかに黄色の固体として得た。エーテルで粉末化して表題生成物を白色粉末(705mg、85%)として得た。TLC(メタノール/塩化メチレン、1:9):R_f0.63。 $C_{24}H_{30}ClF_2N_3O_5$ についてのMS: MH⁺=514/516; (M-H)⁻=512/514。

30

40

実施例49

N-[(3-クロロ-5-フルオロ-1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

アニソール(1mL)および塩化メチレン(10mL)中のN-[(3-クロロ-5-フルオロ-1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(682mg)溶液を、TFA(5mL)で処理し、得られた反応混合物を窒素雰囲気下、室温で45分間攪拌した。反応混合物を濃縮し、塩化メチレンでチェイスし、次いで、エーテルで粉末化して表題生成物を白色粉末(500mg)として得た。 $C_{20}H_{22}ClF_2N_3O_5$ についてのMS: MH⁺=458/460; (M-H)⁻=456/458。

50

実施例50

N-[(1-(3'-フェニルプロピル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMAP(122mg、1.0mmol)およびEDAC(249mg、1.3mmol)を、固体として、1-(3'-フェニルプロピル)インドール-2-カルボン酸(2mLのDMF中、279mg、1.0mmol)のDMF溶液に加え、得られた混合物を窒素雰囲気下、0℃で10分間攪拌した。N-(バリニル)-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(2mLの塩化メチレン中、306mg、1.0mmol)の塩化メチレン溶液を反応混合物に加え、この混合物を窒素雰囲気下、0℃で1時間、次いで、室温で4時間攪拌した。黄色反応混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配し、水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、5%KHSO₄溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(×2)およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して粗固体(0.827g)を得た。粗固体を、酢酸エチル/ヘキサン(1:2)で溶出するシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーに供し、表題生成物をわずかに黄色の固体(171mg)として得た。TLC(酢酸エチル/ヘキサン、2:1):R_f=0.57。

10

実施例51

N-[(1-(3'-フェニルプロピル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMSO(0.11mL、1.5mmol)を、塩化オキサリル(3.5mLの塩化メチレン中、0.22mL、2.0M、0.44mmol)の塩化メチレン溶液に加え、得られた溶液を窒素雰囲気下、-78℃で10分間攪拌した。N-[(1-(3'-フェニルプロピル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(1.5mLの乾燥塩化メチレン中、169mg、0.3mmol)の塩化メチレン溶液を滴下し、得られた溶液を-78℃で15分間攪拌した。トリエチルアミン(0.25mL、1.8mmol)を反応混合物に滴下し、この混合物を-78℃で10分間攪拌し、次いで、室温まで加温した。反応混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配し、水層を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を5%KHSO₄溶液およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して粗生成物を得た。粗生成物をヘキサンで粉末化して表題生成物をわずかに黄色の粉末(129mg、77%)として得た。TLC(酢酸エチル/ヘキサン、2:1):R_f=0.69。

20

実施例52

N-[(1-(3'-フェニルプロピル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

30

アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中のN-[(1-(3'-フェニルプロピル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(97mg)溶液を、TFA(1mL)で処理し、得られた反応混合物を窒素雰囲気下、室温で1時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、塩化メチレンでチェイスし、次いで、エーテルで粉末化して表題生成物をわずかに黄色の粉末(44mg)として得た。TLC(塩化メチレン/メタノール/酢酸、20:1:1):R_f=0.4; C₃₂H₄₀FN₃O₅についてのMS:MH⁺=510;(M-H)⁻=508。

実施例53

N-[(1-フェニルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

40

DMAP(122mg、1.0mmol)およびEDAC(249mg、1.3mmol)を、固体として、1-フェニルインドール-2-カルボン酸(2mLのDMF中、237mg、1.0mmol)のDMF溶液に加え、得られた反応混合物を窒素雰囲気下、0℃で10分間攪拌した。N-(バリニル)-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(2mLの塩化メチレン中、306mg、1.0mmol)の塩化メチレン溶液を反応混合物に加え、この混合物を窒素雰囲気下、0℃で1時間および室温で4時間攪拌した。黄色反応混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配し、水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、5%KHSO₄溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(×2)およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して無色ガラス(0.827g)を得た。粗生成物を、酢酸エチル/ヘキサン(1:2)を用いるシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーに供し、表題生成物を白色泡状物質(400mg、78%)

50

として得た。TLC（酢酸エチル／ヘキサン、1：1）： $R_f=0.27$ 。

実施例54

N-[(1-フェニルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMSO(0.13mL、1.9mmol)を、塩化オキサリル(4mLの塩化メチレン中、0.29mL、2.0M、0.58mmol)の塩化メチレン溶液に加え、得られた溶液を窒素雰囲気下、78℃で10分間攪拌した。N-[(1-フェニルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(2mLの乾燥塩化メチレン中、200mg、0.38mmol)の塩化メチレン溶液を滴下し、得られた混合物を-78℃で15分間攪拌した。トリエチルアミン(0.30mL、2.1mmol)を混合物に滴下し、得られた混合物を-78℃で10分間攪拌し、次いで、室温まで加温した。反応混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配し、水層を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を5%KHSO₄溶液およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して粗生成物を得た。粗生成物を粉末化して表題生成物をわずかに黄色の粉末(181mg)として得た。TLC（酢酸エチル／ヘキサン、1：1）： $R_f=0.43$ 。

10

実施例55

N-[(1-フェニルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中のN-[(1-フェニルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(154mg)溶液を、TFA(1mL)で処理し、得られた反応混合物を窒素雰囲気下、室温で1時間攪拌した。反応混合物を濃縮し、塩化メチレンでチェイスし、次いで、エーテルで粉末化して表題生成物を白色粉末(100mg)として得た。TLC（塩化メチレン／メタノール／酢酸、20:1:1）： $R_f=0.38$ ；C₂₅H₂₆FN₃O₅についてのMS： $MH^+=468$ ； $(M-H)^-=466$ 。

20

実施例56

N-[(1-(2'-((1'-t-ブトキシ-1'-オキソ)エチル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMAP(122mg、1.0mmol)およびEDAC(249mg、1.3mmol)を、固体として、(1-(2'-((1'-t-ブトキシ-1'-オキソ)エチル)インドール-2-カルボン酸(2mLのDMF中、275mg、1.0mmol)のDMF溶液に加え、得られた溶液を窒素雰囲気下、0℃で10分間攪拌した。N-(バリニル)-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(2mLの塩化メチレン中、306mg、1.0mmol)の塩化メチレン溶液をこれに加え、窒素雰囲気下、0℃で1時間および室温で4時間攪拌した。黄色反応混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配し、水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた酢酸エチル溶液を、5%KHSO₄溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液(×2)およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して無色ガラス(0.827g)を得た。粗生成物を、酢酸エチル／ヘキサン(1:1)を用いるシリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーに供し、表題生成物を白色泡状物質(461mg)として得た。TLC（酢酸エチル／ヘキサン、30:70）： $R_f=0.11$ 。

30

実施例57

N-[(1-(2'-((1'-t-ブトキシ-1'-オキソ)エチル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

40

乾燥塩化メチレン(2mL)中のN-[(1-(2'-((1'-t-ブトキシ-1'-オキソ)エチル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(230mg、0.41mmol)、N-メチルモルホリンN-オキシド(71mg、0.61mmol)および粉末状モレキュラーシーブ(205mg)の混合物を、窒素雰囲気下、室温で1.5時間攪拌した。過ルテニウム酸テトラ(プロピル)アンモニウム(7mg)を加え、得られた混合物を窒素雰囲気下、室温で2時間攪拌した。反応混合物を、酢酸エチルを溶出液として用いてシリカゲルを通して濾過した。濾液を濃縮し、酢酸エチル／ヘキサン(約1：2～約1：1)を用いてシリカゲル上でクロマトグラフにかけ、表題生成物を黄色オイル(100mg)として得た。TLC（酢酸エチル／ヘキサン30/70）： $R_f=0.27$ 。

50

実施例58

N-[(1-(カルボキシメチル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

アニソール(0.2mL)および塩化メチレン(2mL)中のN-[(1-(2'-((1'-t-ブトキシ-1'-オキソ)エチル)インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(100mg)溶液を、TFA(1mL)で処理した。得られた反応混合物を窒素雰囲気下、室温で30分間攪拌した。反応混合物を濃縮し、塩化メチレンでチェイスし、次いで、エーテルで粉末化して表題生成物を薄い黄色粉末(26mg)として得た。TLC(塩化メチレン/メタノール、8:1:1) : $R_f=0.32$; $C_{21}H_{24}FN_3O_7$ についてのMS : $MH^+=450$; $(M-H)^-=448$ 。

10

実施例59

N-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

塩化メチレン(5mL)中の1-メチルインドール2-カルボン酸(130mg、0.74mmol)およびN-(バリニル)-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、tert-ブチルエステルの溶液に、そして0℃まで冷却した。固体の4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(95mg、0.78mmol)および1-(3'-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDAC)(200mg、1.04mmol)を、0℃で溶液に加えた。反応混合物を0℃で1時間攪拌し、そして室温までゆっくりと加温した。4時間後、反応物を酢酸エチル(EtOAc)および5% $KHSO_4$ 水溶液の間で分配した。有機層を、5% $KHSO_4$ 溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液、ブラインで洗浄し、乾燥し(Na_2SO_4)、そして濃縮して泡状物質を得た。粗残渣をジエチルエーテルで粉末化し、そして固体を濾過して表題化合物を薄い茶色固体(224mg、収率65%)として得た。TLC(MeOH: CH_2Cl_2 、1:9) : $R_f=0.46$ 。

20

実施例60

N-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル

DMSO(1mL)中のN-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(51mg、0.11mmol)の溶液に、Dess-Martinパーヨージナン(periodinane)(110mg)を加えた。室温で30分後、反応混合物を酢酸エチルおよび水の間に分配した。有機層を、水およびブラインで洗浄し、乾燥し、そして濃縮して白色固体を得た。ジエチルエーテルで粉末化し、そして固体を収集して表題化合物を白色固体(25mg、収率49%)として得た。TLC(MeOH: CH_2Cl_2 、5:95) : $R_f=0.48$ 。

30

実施例61

N-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

CH_2Cl_2 (1mL)中のN-[(1-メチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸、t-ブチルエステル(19mg、0.041mmol)およびアニソール(0.1mL)の溶液を、室温でトリフルオロ酢酸(0.5mL)で処理した。30分後、反応混合物を濃縮し、そして塩化メチレンでチェイスした。粗残渣をジエチルエーテルで粉末化し、そして固体を濾過して表題化合物を薄い茶色固体(12mg、収率72%)として得た。TLC(AcOH:MeOH: CH_2Cl_2 、1:1:20) : $R_f=0.59$ 。 $C_{20}H_{24}FN_3O_5$ についてのマスペクトル : $[MH]^+=406$ 、 $[MH]^-=404$ 。

40

実施例59～61に示す方法に従って、以下の化合物を調製した：

実施例62

N-[(1,3-ジメチル-5-フルオロインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

収率57% ; TLC(MeOH: CH_2Cl_2 、5:95) : $R_f=0.56$ 。 $C_{21}H_{25}F_2N_3O_5$ についてのマスペクトル : $[MH]^+=438$ 、 $[MH]^-=436$ 。

実施例63

N-[(1-ホモアリルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

50

収率29% ; TLC (MeOH:CH₂Cl₂、1:9) : R_f=0.33。C₂₃H₂₈FN₃O₅についてのマスペクトル : [MH]⁺446、[MNa]⁺468、[MH]⁻444。

実施例64

N-[(1-メチル-5-フルオロインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

収率89% ; TLC (MeOH:CH₂Cl₂、9:1) : R_f=0.14。C₂₀H₂₃F₂N₃O₅についてのマスペクトル : [MH]⁺424、[MH]⁻422。

実施例65

N-[(1-メチル-3-イソブチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

収率50% ; TLC (MeOH:CH₂Cl₂、9:1) : R_f=0.20。C₂₄H₃₂FN₃O₅についてのマスペクトル : [MH]⁺462、[MH]⁻460。

実施例66

N-[(1-メチル-3-フェネチルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

収率38% ; TLC (酢酸エチル:ヘキサン、1:1) : R_f=0.19。C₂₈H₃₂FN₃O₅についてのマスペクトル : [MH]⁺510、[MH]⁻508。

実施例67

N-[(1-メチル-5-0ベンジルインドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-4-オキソ-5-フルオロペンタン酸

収率78% ; TLC (酢酸エチル:ヘキサン、1:1) : R_f=0.17。C₂₇H₃₀FN₃O₆についてのマスペクトル : [MH]⁺512、[MH]⁻510。

実施例68

N-(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)バリニル-3-アミノ-5-ブロモ-4-オキソ-ペンタン酸、t-ブチルエステル

1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(3.19g、20.8mmol)および1-(3'-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDAC)(5.60g、29.2mmol)を、窒素下、0℃で、塩化メチレン/ジメチルホルムアミド(DMF)(60ml/30ml)中のN-カルボベンジルオキシカルボニルバリニル(5.24g、20.8mmol)の攪拌溶液に加えた。15分後、アスパラギン酸α-メチル、β-tert-ブチルジエステル(5.00g、20.8mmol)を、固体として加え、続いてニートの4-メチルモルホリン(2.40ml、21.8mmol)を加えた。0℃で1時間および室温で5時間攪拌後、混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配した。水溶液を酢酸エチルで逆抽出し、そして合わせた抽出物を飽和NaHCO₃およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して固体を得た。エーテルで粉末化し、N-[カルボベンジルオキシカルボニルバリニル]アスパラギン酸、α-メチル、β-tert-ブチルジエステルを白色固体(8.36g、92%)として得た。TLC(CH₂Cl₂/MeOH、95/5) : R_f=0.48。

200mlのメタノール中の上記生成物(4.00g、9.17mmol)の溶液を、水素雰囲気下(1atm)で50分間、活性炭担持パラジウム(0.45g)と共に攪拌した。次いで、反応混合物をセライトのパッドを通して濾過し、濾過ケーキをメタノールおよび塩化メチレンで洗浄した。濾液を合わせ、濃縮し、そして残渣を塩化メチレンでチェイスしてN-[バリニル]アスパラギン酸、α-メチル、β-tert-ブチルジエステルを白色固体(2.75g、99%)として得た。TLC(CH₂Cl₂/MeOH、95/5) : R_f=0.10。

DMF(30ml)中の上記生成物(2.75g、9.11mmol)および1,3-ジメチルインドール-2-カルボン酸(1.95g、10.3mmol)の濁った混合物に、4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)(1.26g、10.3mmol)および1-(3'-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩(EDAC)(2.37g、12.4mmol)を加えた。反応混合物を、窒素雰囲気下、0℃で1時間および室温で3時間攪拌した。次いで、反応混合物を酢酸エチルと5%KHSO₄溶液との間で分配し、そして水溶液を酢酸エチルで逆抽出した。合わせた抽出物を飽和NaHCO₃溶液、水、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮して固体を得た。固体をエーテルで粉末化し、N-[(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)バリニル]アスパラギン酸、α-メチ

10

20

30

40

50

ル、 β -tert-ブチルジエステルを白色粉末(2.87g、67%)として得た。TLC($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 、95/5)： $R_f=0.59$ 。

水酸化リチウムの水溶液(1.0M、2.98ml)を、1,4-ジオキサン(10ml)中の上記生成物(1.41g、2.98mmol)の懸濁液に滴下した。室温で30分間攪拌後、得られた透明液(clear)を、1N塩酸溶液で酸性化し、そして水で希釈した。得られた白色沈澱を、吸引濾過により集め、そして水および少量のエーテルで連続して洗浄し、N-[(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)バリニル]アスパラギン酸、 β -tert-ブチルジエステルを白色粉末(1.18g、86%)として得た。TLC($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 、90/10)： $R_f=0.21$ 。

THF(20ml)中の上記生成物(1.03g、2.24mmol)および4-メチルモルホリン(0.35ml、3.14mmol)の溶液に、窒素下、 -10°C で、イソブチルクロロホルメート(0.380ml、2.92mmol)を滴下した。反応混合物を、窒素雰囲気下、 -10°C で15分間攪拌し、そして濾過した。濾過ケーキを乾燥THFで洗浄し、そして濾液を合わせ、 0°C まで冷却した。次いで、濾液を新しく調製したジアゾメタンのエーテル溶液(過剰)で処理した。混合物を 0°C で1時間攪拌した後、臭化水素酸(48重量%、水溶液)および酢酸(6ml、1/1)の混合物を、ガスの発生が終わるまで滴下した。さらに5分後、反応混合物を濃縮し、そして酢酸エチルと水との間で分配した。水層を酢酸エチルで逆抽出した。有機層を合わせ、水、飽和 NaHCO_3 溶液、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮した。残渣をエーテルで粉末化し、表題化合物を白色粉末(1.00g、83%)として得た。TLC($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 、95/5)： $R_f=0.88$ 。

実施例69

N-[(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)-バリニル]-3-アミノ-5-(2,6-ジクロロベンゾイル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸、t-ブチルエステル

2,6-ジクロロ安息香酸(0.023g、0.12mmol)およびフッ化カリウム(0.015g、0.25mmol)の混合物に、窒素下、室温にて、N-[(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)バリニル]-3-アミノ-5-ブロモ-4-オキソ-ペンタン酸、tert-ブチルエステル(0.054g、0.10mmol)を一度に加えた。室温でさらに16時間攪拌後、混合物を酢酸エチルおよび水の間で分配した。有機層を、水、飽和 NaHCO_3 溶液、およびブラインで洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そして濃縮した。エーテルで粉末化して表題化合物を白色粉末(0.051g、79%)として得た。TLC($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 、95:5)： $R_f=0.88$ 。

実施例70

N-[N-(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)-バリニル]-3-アミノ-5-(2,6-ジクロロベンゾイル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸

トリフルオロ酢酸(2mL)を、アニソール(0.2mL)を含有する塩化メチレン中のN-(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)-バリニル-3-アミノ-5-(2,6-ジクロロベンゾイル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸、tert-ブチルエステル(0.0340g、0.0526mmol)の攪拌溶液に加えた。反応混合物を、窒素下、室温で半時間攪拌し、そして濃縮した。残渣を塩化メチレンと共沸し、そしてエーテルで粉末化して表題化合物を白色粉末(0.0270g、87%)として得た。TLC($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 、20/1/1)： $R_f=0.43$ 。 $\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_7$ についてのMS： $[\text{MH}]^+ 590/592$ 、 $[\text{MH}]^- 588/590$ 。

実施例69～70に示す方法に従って、以下の化合物を調製した：

実施例71

N-(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)-バリニル-3-アミノ-5-(ジフェニルホスフィニル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸

収率24%；TLC($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH}$ 、20/1/1)： $R_f=0.31$ 。 $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{PN}_3\text{O}_7$ についてのMS： $[\text{MH}]^+ 618$ 、 $[\text{MH}]^- 616$ 。

実施例72

N-(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)-バリニル-3-アミノ-5-(1-フェニル-3-(トリフルオロメチル)ピラゾール-5-イル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸

収率49%；TLC($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 、90/10)： $R_f=0.29$ 。 $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{F}_3\text{N}_5\text{O}_6$ についてのMS： $[\text{MH}]^+ 628$ 、 $[\text{MH}]^- 626$ 。

実施例73

N-(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)-バリニル-3-アミノ-5-(3-(N-フェニル)アミノカルボニル-2-ナフチル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸

収率68% ; TLC (CH₂Cl₂/MeOH、80/20) : R_f=0.46。C₃₈H₃₈N₄O₇についてのMS : [MH]⁺663、[MH]⁻661。

実施例74

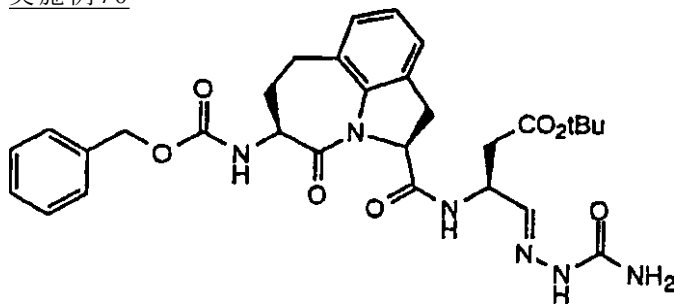
N-(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)-バリニル-3-アミノ-5-(2-アミノカルボニル-1-フェニル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸

収率61% ; TLC (CH₂Cl₂/MeOH/HOAc、8/1/1) : R_f=0.32。C₂₈H₃₂N₄O₇についてのMS : [MH]⁺537、[MH]⁻535。

実施例75

N-(1,3-ジメチル-インドール-2-カルボニル)-バリニル-3-アミノ-5-(ジメチルホスフィニル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸

収率76% ; TLC (CH₂Cl₂/MeOH、90/10) : R_f=0.12。C₂₃H₃₂PN₃O₇についてのMS : [MH]⁺494、[MH]⁻492。

実施例76

(2S-cis) -[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン

1. (2S-cis) -5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボン酸エチルエステルの調製

塩化メチレン (4mL) 中、(2S-cis) -5-アミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボン酸エチルエステル (0.437g、1.73mmol、Tetrahedron Letters 36, 1593-1596頁(1995)および米国特許5,504,080 (1996年4月2日)に記載のように調製) に、0℃で攪拌しながら、ベンジルククロホルメート (0.370mL、2.6mmol) およびトリエチルアミン (0.724mL、5.2mmol) を添加し、そして得られる混合物を窒素下45分間攪拌した。反応を水でクエンチし、次いで酢酸エチルおよび5%重硫酸カリウム水溶液の間に分配した。水層を2回、酢酸エチルで逆抽出し、次いで合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そしてエバポレートし乾燥した。粗生成物のシリカゲル (S/Pブランド シリカゲル60Å、230~400メッシュASTM) を用い酢酸エチル-ヘキサン (2:1) で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによる精製により、粗生成物0.558g (68%) を得た。酢酸エチル-ヘキサン (1:4) で粉末化し、白色固体として表題化合物0.480gを得た。 ; 融点: 139~140℃ ; TLC (酢酸エチル-ヘキサン、2:1) : R_f = 0.6 ;

¹H-

NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.35-7.30 (m, 5H), 7.02-6.94 (m, 3H), 6.17 (d, J=5.4 Hz, 1H), 4.15 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.46 (dd, J=11.0, 16.7 Hz, 1H), 3.29 (m, 1H), 3.10 (d, J=116.5, 2H), 2.35 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 1.23 (t, J=7.2 Hz, 3H).

2. (2S-cis)-5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボン酸の調製

1,4-ジオキサン (7.5mL) および水 (2.5mL) 中の、(2S-cis) -5-ベンジルオキシカルボ

10

20

30

40

50

ニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボン酸エチルエステル (0.428g、1.05mmol) の溶液に、1 M 水酸化リチウム水溶液 (1.6mL、1.6mmol) を添加し、そして得られる混合物を室温で窒素下 30 分間攪拌した。反応混合物を 5 % 重硫酸カリウム塩化ナトリウム水溶液で pH 3 に酸性化した。水層を 2 回、酢酸エチルで逆抽出し、そして合わせた有機層を硫酸ナトリウムで乾燥し、そしてエバポレートし乾燥し、細かい白色固体として表題化合物 0.395g (99%) を得た。；融点：188~189°C；TLC (塩化メチレン-メタノール-酢酸、9：1：1)：Rf = 0.55；

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ

7.34-7.26 (m, 5H), 7.07-6.97 (m, 3H), 6.08 (d, J=5.7 Hz, 1H), 5.25 (dd, J=3.2, 9.8 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.30 (m, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.06 (d, J=12.0 Hz, 1H), 2.36 (m, 1H), 2.09 (m, 1H).

3. N- (ベンジルオキシカルボニル) -L- (N'-メチル-N'-メトキシ) アスパラギン酸アミド β - (tert-ブチルエステル) の調製

CH₂Cl₂ (150mL) 中の N- (ベンジルオキシカルボニル) -L-アスパラギン酸-β - (tert-ブチル) エステル (14.65g、45.3mmol、Bachem) 溶液に、0 °C (氷浴) で窒素下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (7.29g、47.6mmol、Aldrich) を、続いて 1-エチル-3- (3',3'-ジメチル-1'-アミノプロピル) カルボジイミド塩酸 (9.55g、49.8mmol、Sigma) を添加した。0 °C で 15 分間攪拌後、N,0-ジメチルヒドロキシルアミン塩酸 (5.10g、52.3mmol、Aldrich) および N-メチルモルホリン (5.8mL、53mmol、Aldrich) を添加した。混合物を 3 時間かけて室温に温め、次いで室温で 16 時間攪拌した。溶液を真空下、濃縮し、そして残渣を酢酸エチル-5 % KHSO₄ (各 200mL) の間に分配した。有機層をそれぞれ 5 % KHSO₄、飽和重炭酸ナトリウム、そして飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、そしてエバポレートしオイルにした。オイルをヘキサンから結晶化し、綿毛状白色結晶固体として表題化合物 (16.10g、収率 97%) を得た。TLC (酢酸エチル)、単一点 (UV および PMA)：Rf = 0.37。

上記のものと類似の手順により、N- (ベンジルオキシカルボニル) -L-アスパラギン酸-β - (tert-ブチル) エステル (2 倍スケールアップ) 29.3g で開始し、表題生成物 31.18g (収率 94%) を得た。

4. N- (ベンジルオキシカルボニル) -L-アスパラギン酸セミカルバゾン β - (tert-ブチル) エステルの調製

無水エーテル (400mL) 中の N- (ベンジルオキシカルボニル) -L- (N'-メチル-N'-メトキシ) アスパラギン酸アミド β - (tert-ブチルエステル) (15.50g、42.3mmol) の溶液に、0 °C (氷浴) で窒素雰囲気下、エーテル中の LiAlH₄ の 1.0 M 溶液 (22.0mL、22.0mmol、Aldrich) を、反応溶液温度を 0 ~ 5 °C の間に保つような速度で滴下した (添加時間 15~20 分)。水素化リチウムアルミニウム試薬の添加が完了した後、混合物を 0 ~ 5 °C で 1 時間、攪拌し、次いで 0.3 N KHSO₄ 溶液 (100mL) の滴下によってクエンチした。得られる混合物を分離漏斗に移し十分な 5 % KHSO₄ 溶液 (75mL) を加え固体を溶解した。有機層を分離し、そして合わせた洗浄水をエーテル (100mL) で逆抽出した。合わせたエーテル抽出物を飽和 NaCl 溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、そして最小限加熱して真空で濃縮した。TLC (酢酸エチル)：筋状点 (UV および PMA) Rf = 0.48。TLC (メタノール/塩化メチレン、1：9) 主要点 (UV および PMA) Rf = 0.75。

粗アルデヒドを直ちに水性エタノール (水 45mL/アルコール 105mL) 中に取り、氷浴中に置き、そして酢酸ナトリウム (3.82g、46.6mmol) および塩酸セミカルバジド (5.20g、46.6mmol、Aldrich) で処理した。

混合物を、0 °C (氷浴) で窒素雰囲気下 3 時間攪拌し、室温に温め、そして、一晚 (16 時間) 攪拌した。ほとんどのエタノールを真空下、除去し、そして残渣を、酢酸エチルおよび水 (各 100mL) の間で分配した。有機相を、それぞれ 5 % KHSO₄、飽和重炭酸ナトリウムそして飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そしてエバポレート

し乾燥した。この反応粗生成物を、N-（ベンジルオキシカルボニル）-L-（N'-メチル-N'-メトキシ）アスパラギン酸アミドβ-（tert-ブチルエステル）15.40gおよび4.625gで開始する2つの類似の手順のものと合わせ（計：35.525g、97mmol）、そしてこれらの合わせた生成物を、シリカゲルを用いアセトン／塩化メチレン（3：7）、次いでメタノール-アセトン-塩化メチレン（0.5:3:7）で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、無色の泡状物質として純粋な表題生成物（27.73g、78.5%）を得た。TLC（MeOH-CH₂Cl₂、1：9）：単一点（UVおよびPMA）、Rf=0.51。

5. L-アスパラギン酸セミカルバゾンβ-（tert-ブチル）エステルp-トルエンスルホン酸塩の調製

純粋エタノール（250mL）中のN-（ベンジルオキシカルボニル）-L-アスパラギン酸セミカルバゾンβ-（tert-ブチル）エステル（13.84g、38.0mmol）の溶液に、10%Pd/C（1.50g、Aldrich）を添加し、そして得られる混合物を水素雰囲気下（バルーン）、TLC（メタノール／塩化メチレン、1：9）が発効物質の完全な消費を示すまで（60分）攪拌した。注意：生成物が過剰に還元され得るので、この反応をきっちりとフォローすることが重要である。混合物をセライトを通して濾過し、そしてエバポレートしオイルにした。オイルを塩化メチレン（75mL×2）で、次いで塩化メチレン／トルエン（1：1、75mL）で追い出し、白色結晶固体として粗アミンを得た。TLC（EtOAc-ピリジン-AcOH-H₂O；60：25：5：10）単一点（UVおよびPMA）Rf=0.24。注意：このTLC系では、あらゆる過剰に還元された生成物が、所望の生成物のすぐ下に現れる、Rf=0.18（PMAのみ）。

粗アミンをCH₃CN（60mL）中に取り、そしてアセトニトリル（60mL）中のp-トルエンスルホン酸1水和物（7.22g、38.0mmol）で処理した。結晶沈殿物を集め、アセトニトリルおよびエーテルで洗浄し、そして風乾し白色結晶固体として表題生成物（13.95g、収率92%）を得た。

この物質の光学純度を、対応するMosherアミドへの変換〔（R）-（-）-α-メトキシ-α-（トリフルオロメチル）フェニルアセチルクロライド1.05当量、CH₂Cl₂中のi-Pr₂NEt 2.1当量、室温、30分〕により調べた。所望の生成物は、2重線（7.13ppm、1H、d、J=2.4Hz、CH=N）を有するが、そのジアステレオマーの対応するシグナルは、7.07ppmであった。以上の手順から得られる表題化合物の光学純度は、代表的に>95:5である。

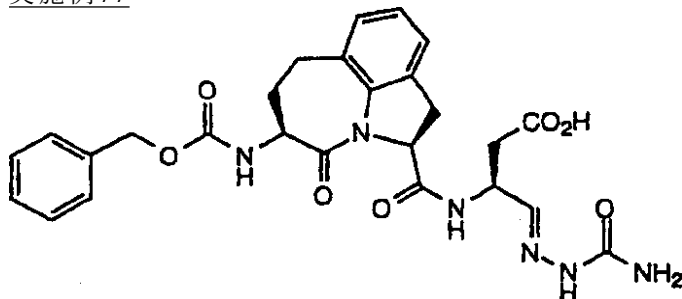
6. (2S-cis)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル]アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステル セミカルバゾン

塩化メチレン（7mL）中の（2S-cis）-5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボン酸（0.375g、0.989mmol）の溶液に、攪拌しながら、0℃で窒素下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物（0.182g、1.19mmol）および1-エチル-3-（3',3'-ジメチル-1'-アミノプロピル）カルボジイミド塩酸（0.284g、1.48mmol）を添加した。15分後、L-アスパル酸セミカルバゾンb-（tert-ブチル）エステル、p-トルエンスルホン酸塩（0.386g、0.989mmol）およびN-メチルモルホリン（0.163mL、1.48mmol）を添加し、そして得られる反応混合物を1時間内に室温にした。一晩、攪拌の後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%重硫酸カリウムおよび飽和塩化ナトリウム溶液でよく洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥し、そしてエバポレートし乾燥した。粗生成物をシリカゲル（S/Pブランドシリカゲル60Å、230～400メッシュASTM）を用い2%メタノール-塩化メチレンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、白色泡状物質として表題化合物0.463g（79%）を得た。TLC（塩化メチレン-メタノール、9：1）：Rf=0.5。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ

8.42 (s, 1H), 7.82 (d, J=8.1 Hz, 1H), 7.32 (m, 5H), 7.07 (m, 3H), 5.94 (d, J=6.3 Hz, 1H), 5.26 (d, J=9 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.82 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 3.56 (d, J=18 Hz, 1H), 3.27 (m, 2H), 3.07 (m, 1H), 2.64 (dd, J=4.7, 15.8 Hz, 1H), 2.44 (dd, J=6.6, 15.9 Hz, 2H), 2.22 (m, 1H), 1.30 (s, 9H). 質量スペクトル: m/z 593 (M+H).

実施例 77



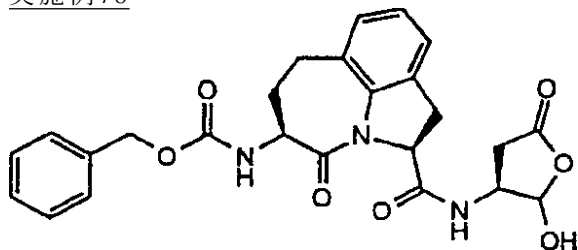
(2-cis) - [5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

塩化メチレン (1.5mL) 中の (2S-cis) - [5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸 tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.214g, 0.362mmol) の溶液に、アニソール (0.5mL, 4.34mmol)、続いてトリフルオロ酢酸 (0.75mL) を添加した。室温で、窒素下、2 時間、撹拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンで 2 回、チェイス (chase) し、表題化合物 (0.195g) を得た。TLC (塩化メチレン-メタノール、95 : 5) R_f = 0.2。

¹H-NMR (300

MHz, CDCl₃) δ 9.77 (bs, 1H), 8.32 (d, J=12 Hz, 1H), 8.12 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.31-7.27 (m, 5H) 7.13-7.04 (m, 3H), 6.64 (m, 1H) 5.32 (d, J=9.9 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.86 (m, 1H), 4.41 (m, 1H), 3.56 (d, J=15 Hz, 1H), 3.25 (m, 2H), 3.10 (m, 2H), 2.64 (m, 2H), 2.28 (m, 2H).

実施例 78



(2-cis) - [5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸

(2-cis) - [5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン (0.195g, 0.36mmol) を、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒド (2 mL) の 3 : 1 : 1 溶液で処理し、そして得られる混合物を窒素下、1.5 時間、撹拌した。反応混合物を水で希釈し、メタノールをエバポレートにより除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。逆相ゲル (MC I ゲル、CHP-20P、75~150ミクロン) を用い、10%~80%メタノール-水勾配で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによる粗生成物の精製に

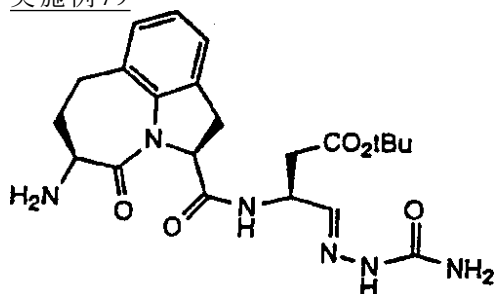
より、凍結乾燥後、白色固体として表題化合物 (0.073g、42%) を得た；m.p.101~104℃。TLC (塩化メチレン-メタノール-酢酸、97:2.5:0.5) Rf=0.45。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 7.45 (m, 1H), 7.30 (s, 5H), 7.07 (d, J=3.3 Hz, 1H), 7.00 (d, J=4.8 Hz, 2H), 6.12 (m, 1H), 5.17 (d, J=9.6 Hz, 1H), 5.07 (s, 2H), 4.49 (m, 1H), 4.28 (m, 1H), 3.46 (d, J=9.9 Hz, 1H), 3.30-3.12 (m, 2H), 3.04-2.99 (m, 1H), 2.83-2.76 (m, 1H), 2.46-2.33 (m, 2H), 2.03 (bs, 1H).

質量スペクトル : m/z 480 (M+H).

実施例 79

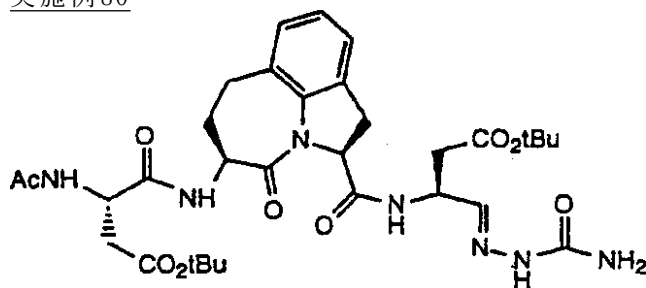


(2S-cis) - [5-アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン炭素担持10%パラジウム (0.180g) をメタノール (27mL) 中の (2S-cis) - [5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.308g、0.520mmol) の溶液に添加し、得られる混合物を水素のバルーンを用い (1atm、室温) 18時間、水素付加した。混合物を、セライトを通して濾過し、エバポレートして乾燥し、次いで、トルエンで2回、追い出し、灰白色の固体として表題化合物を得た (0.215g)。TLC (塩化メチレン-メタノール、9:1) Rf=0.15。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.53

(s, 1H), 7.89 (d, J=7.6 Hz, 1H), 7.13 (m, 3H), 5.21 (dd, J=2.3, 10.14 Hz, 1H), 4.82 (m, 1H), 3.52 (m, 1H), 3.24 (dd, J=10.3, 16.3 Hz, 1H), 3.03 (m, 2H), 2.62 & 2.42 (AB, dd, J=4.2, 7.1, 15.7 Hz, 2H), 2.19 (m, 1H), 1.32 (s, 9H).

実施例 80



(2S-cis) - [5-(N-アセチル-(S)-アスパルチル-b-tert-ブチルエステル) アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン

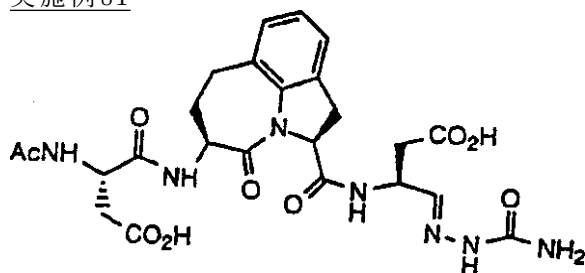
塩化メチレン (1.5mL) 中のN-アセチルアスパラギン酸、β-tert-ブチルエステル (0.120g、0.517mmol) の溶液に、攪拌しながら、0℃で、窒素下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (0.086g、0.564mmol) および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド (0.135g、0.705mmol) を添加した。15分後、塩化メチレン (2mL) 中の (2S-cis) - [5-アミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1

-hi]インドール-2-カルボニルアミノ]-4-オキソブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.213g, 0.47mmol) の溶液を添加し、そして反応物を1時間かけて室温にした。一晚、攪拌の後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウムそして飽和塩化ナトリウム溶液で続けて洗浄し、乾燥(硫酸ナトリウム)し、そしてエバポレートし乾燥した。粗生成物をシリカゲル(S/Pブランド シリカゲル60 Å、230~400メッシュASTM)を用い5%次いで10%メタノール-塩化メチレンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、白色固体として表題化合物0.126g (41%)を得た。TLC (塩化メチレン-メタノール、9:1): Rf = 0.4。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ

9.63 (s, 1H), 8.32 (d, J=7.8 Hz, 1H), 7.82 (d, J=6.6 Hz, 1H), 7.53 (d, J=4.8 Hz, 1H), 7.09 (m, 1H), 7.00 (m, 2H), 5.18 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 4.86 (m, 1H), 4.39 (m, 1H), 3.01 (m, 1H), 2.92 (dd, J= 4.2, 14.7 Hz, 1H) 2.68 (d, J=12.3 Hz, 1H), 2.52 (m, 2H), 2.51 (m, 2H), 2.03 (s, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.24 (s, 9H).

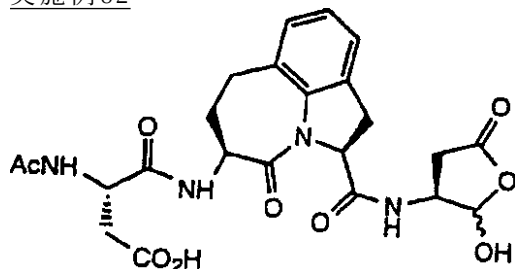
実施例81



(2S-cis)-[5-(N-アセチル-(S)-アスパルチル)アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-L-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

塩化メチレン (1mL) 中の (2S-cis)-[5-(N-アセチル-(S)-アスパルチル-b-tert-ブチルエステル)アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-L-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.117g, 0.178mmol) の溶液に、アニソール (0.5mL)、続いてトリフルオロ酢酸 (1mL) を添加した。室温で、窒素下、2時間、攪拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンで2回チェイスし、表題化合物 (0.099g) を得た。TLC (塩化メチレン-メタノール-酢酸、13:6:1) Rf = 0.2。質量スペクトル: m/z 560 (M+H)。

実施例82

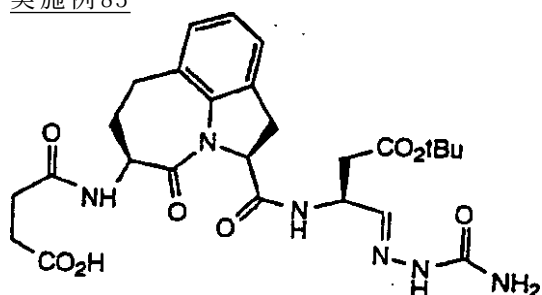


(2S-cis)-[5-(N-アセチル-(S)-アスパルチル)アミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-L-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸

(2S-cis)-[5-(N-アセチル-(S)-アスパルチル)アミノ-1,2,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-L-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン (0.097g, 0.177mmol) を、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒド (2mL) の3:1:1溶液で処理し、そして得られる混合物を窒素下、1.5時間、攪拌した。次いで、反応混合物を水で希釈し、メタノールをエバポレートにより除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。逆相ゲル(MCIゲル、CHP-20P、75-150ミクロン)

を用い、10%～80%メタノール-水勾配で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによる粗生成物の精製により、凍結乾燥後、白色固体として表題化合物（0.050g、56%）を得た；m.p.160～175℃（分解）。TLC（塩化メチレン-メタノール-酢酸、13：6：1）R_f=0.3。質量スペクトル：m/z 503（M+H）。

実施例83



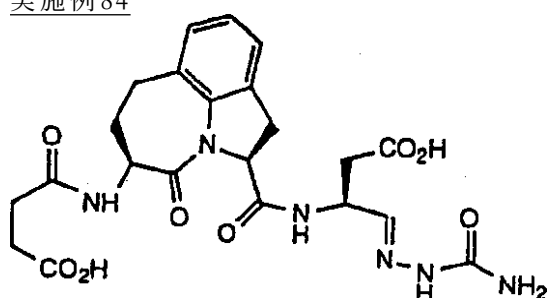
10

(2S-cis)-[5-スクシニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-L-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン

塩化メチレン（6mL）中の（2S-cis）-[5-アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-L-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン（0.197g、0.435mmol）の溶液に、攪拌しながら、0℃で、窒素下、コハク酸無水物（0.057g、0.566mmol）を、続いてピリジン（0.052mL、0.653mmol）を添加した。室温で、窒素下、3時間、攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウム、そして飽和塩化ナトリウム溶液で、続けて洗浄し、乾燥（硫酸ナトリウム）し、そしてエバポレートし乾燥した。粗生成物をシリカゲル（S/Pブランドシリカゲル60Å、230～400メッシュASTM）を用い10%メタノール-塩化メチレン、次いで塩化メチレン-メタノール-酢酸80：19：1で溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、白色固体として表題化合物0.216g（88%）を得た。TLC（塩化メチレン-メタノール-酢酸、8：1：1）R_f=0.5。質量スペクトル：m/z 557（M-H）。

20

実施例84



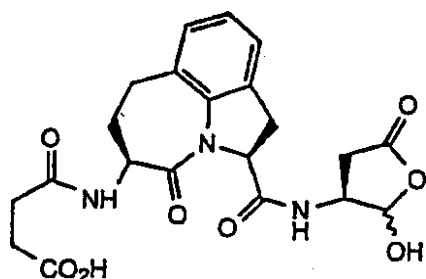
30

(2S-cis)-[5-スクシニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-L-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

塩化メチレン（1mL）中の（2S-cis）-[5-スクシニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-L-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン（0.191g、0.342mmol）の溶液に、アニソール（0.5mL）、続いてトリフルオロ酢酸（1mL）を添加した。室温で、窒素下、2時間、攪拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンで2回チェイスし、表題化合物（0.210g）を得た。TLC（塩化メチレン-メタノール-酢酸、8：1：1）R_f=0.4。質量スペクトル：m/z 503（M+H）。

40

実施例85



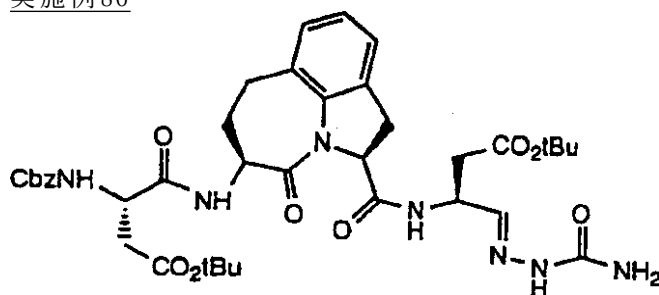
(2S-cis)-[5-(4-oxo-2-oxobutanoate)-1,2,3,4,5,6,7-hexahydro-4-oxoazepino[3,2,1-hi]indole-2-carbonyl]-L-phenylalanine

10

(2S-cis)-[5-(4-oxo-2-oxobutanoate)-1,2,3,4,5,6,7-hexahydro-4-oxoazepino[3,2,1-hi]indole-2-carbonyl]-L-phenylalanine (0.208g, 約0.342mmol) を、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒド (3mL) の3:1:1溶液で処理し、そして得られる混合物を窒素下、1.5時間、攪拌した。次いで、反応混合物を水で希釈し、メタノールをエバポレートにより除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。逆相ゲル (MC I ゲル、CHP-20P、75~150ミクロン) を用い、10%~80%メタノール-水勾配で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによる粗生成物の精製により、凍結乾燥後、白色固体として表題化合物 (0.064g, 42%) を得た; m.p.145~160°C (分解)。TLC (塩化メチレン-メタノール-酢酸、8:1:1) R_f=0.45。質量スペクトル: m/z 446 (M+H)。

20

実施例86



(2S-cis)-[5-(N-benzyloxycarbonyl-L-aspartyl-beta-tert-butylester)-1,2,3,4,5,6,7-hexahydro-4-oxoazepino[3,2,1-hi]indole-2-carbonyl]-L-phenylalanine

30

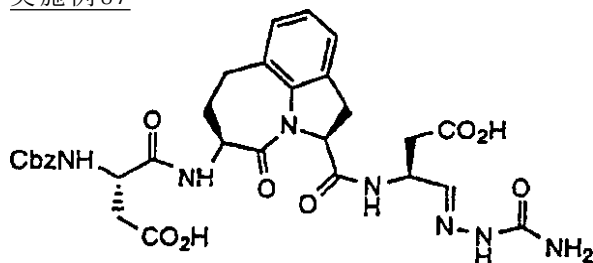
塩化メチレン (1.5mL) 中のN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパルチル-β-tert-ブチルエステル (0.169g, 0.521mmol) の溶液に、攪拌しながら、0°Cで、窒素下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (0.087g, 0.569mmol) および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸 (0.136g, 0.711mmol) を添加した。15分後、塩化メチレン (2mL) 中の (2S-cis)-[5-アミノ-1,2,3,4,5,6,7-hexahydro-4-oxoazepino[3,2,1-hi]indole-2-carbonyl]-L-phenylalanine tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.217g, 0.474mmol) の溶液を添加し、そして反応物を1時間以内に室温にした。一晩、攪拌の後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウムそして飽和塩化ナトリウム溶液で続けて洗浄し、乾燥 (硫酸ナトリウム) し、そしてエバポレートし乾燥した。粗生成物をシリカゲル (S/Pブランド シリカゲル 60 Å、230~400メッシュASTM) を用い2%次いで5%メタノール-塩化メチレンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより精製し、灰白色固体として表題化合物 0.244g (67%) を得た。TLC (塩化メチレン-メタノール、9:1): R_f=0.55。

40

¹H-

NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.13 (s, 1H), 7.85 (d, J= 6 Hz, 1H), 7.56 (d, J= 5.7 Hz, 1H) 7.23 (m, 5H), 7.08 (m, 1H), 7.00 (m, 2H), 5.13 (m, 3H) 4.77 (m, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.43 (m, 1H), 3.60 (d, J= 16 Hz, 1H), 3.22 (m, 2H), 2.98 (m, 1H), 2.83 (d, J= 15.3 Hz, 1H), 2.65 & 2.36 (AB, dd, J= 4.2, 7.7, 16.9 Hz, 2H), 2.42 (m, 1H), 2.10 (m, 1H), 1.35 (s, 9H), 1.24 (s, 9H).

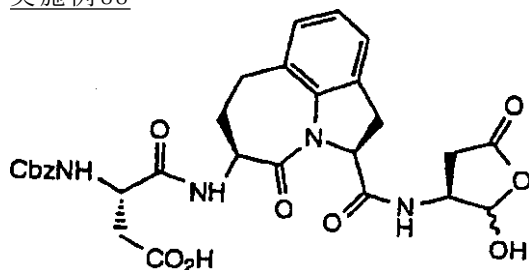
実施例 87



(2S-cis) - [5- (N-ベンジルオキシカルボニル-(S)-アスパルチル) アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ [3,2,1-hi] インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

塩化メチレン (1mL) 中の (2S-cis) - [5- (N-ベンジルオキシカルボニル- (S)-アスパルチル-b-tert-ブチルエステル) アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ [3,2,1-hi] インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸 tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.217g, 0.289mmol) の溶液に、アニソール (0.5mL)、続いてトリフルオロ酢酸 (1mL) を添加した。室温で、窒素下、3 時間、攪拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンで 2 回チェイスし、表題化合物 (0.193g) を得た。TLC (塩化メチレン-メタノール、9 : 1) R_f = 0.35。質量スペクトル : m/z 652 (M+H)。

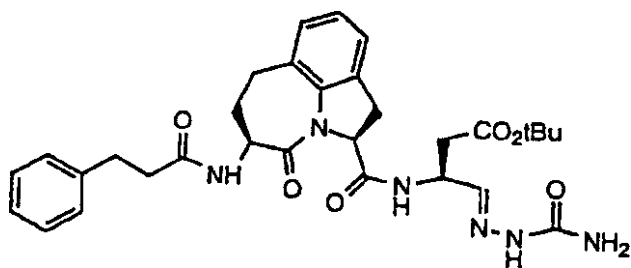
実施例 88



(2S-cis) - [5- (N-ベンジルオキシカルボニル- (S) -アスパルチル) アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ [3,2,1-hi] インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸

(2S-cis) - [5- (N-ベンジルオキシカルボニル- (S) -アスパルチル) アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ [3,2,1-hi] インドール-2-カルボニル) - アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン (0.191g, 0.29mmol)、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒド (2 mL) の 3 : 1 : 1 溶液で処理し、そして得られる混合物を窒素下、2 時間、攪拌した。次いで、反応混合物を水で希釈し、メタノールをエバポレートにより除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。逆相ゲル (MC I ゲル、CHP-20P、75~150ミクロン) を用い、10%~80%メタノール-水勾配で溶出するフラッシュクロマトグラフィーによる粗生成物の精製により、凍結乾燥後、白色固体として表題化合物 (0.111g、64%) を得た ; m.p. 140~144°C (分解)。TLC (塩化メチレン-メタノール、9 : 1) R_f = 0.4。質量スペクトル : m/z 593 (M-H)。

実施例 89



(2S-cis) -[5-ジヒドロシンナミルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピ
ノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) -アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエス
テルセミカルバゾン

塩化メチレン (1.5mL) 中のジヒドロケイ皮酸 (0.169g, 0.521mmol) の溶液に、攪拌しな
がら、0℃で、窒素下、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (0.088g, 0.576mmol)
および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド (0.127
g, 0.665mmol) を添加した。15分後、塩化メチレン (2mL) 中の (2S-cis) -[5-アミノ-
1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) -
アミノ]-4-オキソブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.203g, 0.443mmol) の
溶液を添加し、そして反応物を1時間以内で室温にした。一晩、攪拌の後、反応混合物を
酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウムそして飽和塩化ナトリウム溶液で続け
て洗浄し、乾燥 (硫酸ナトリウム) し、そしてエバポレートし乾燥した。粗生成物をシリ
カゲル (S/Pブランド シリカゲル 60 Å, 230~400メッシュASTM) を用い
2%次いで5%メタノール-塩化メチレンで溶出するフラッシュクロマトグラフィーにより
精製し、灰白色固体として表題化合物0.208g (79%) を得た。TLC (塩化メチレン-
メタノール、9:1) : Rf = 0.7。

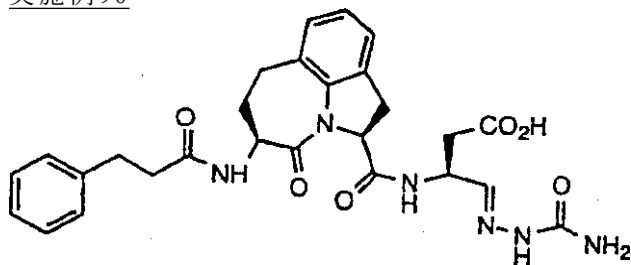
¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 8.82 (s, 1H), 7.72

(d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.19 (m, 5H), 7.06 (m, 1H), 7.01 (m, 2H), 6.76 (d, J = 6.3, 1H), 5.23 (d,

J = 8.4 Hz, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.50 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.26 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 2.94
(m, 2H), 2.53 (m, 4H), 2.28 (m, 1H), 2.06 (m, 1H), 1.29 (s, 9H). 質量スペクトル : m/z 591

(M+H).

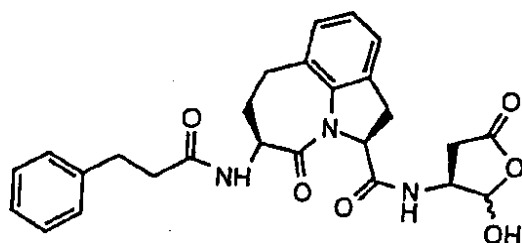
実施例90



(2S-cis) -[5-ジヒドロシンナミルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピ
ノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) -アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

塩化メチレン (1mL) 中の (2S-cis) -[5-ジヒドロシンナミルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキ
サヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル) -アミノ]-4-オキソ-
ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.189g, 0.320mmol) の溶液に、アニソール
(0.5mL)、続いてトリフルオロ酢酸 (1mL) を添加した。室温で、窒素下、3時間、攪拌
した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレ
ンで2回チェイスし、表題化合物 (0.183g) を得た。TLC (塩化メチレン-メタノール
、9:1) Rf = 0.25。質量スペクトル : m/z 535 (M+H)。

実施例91

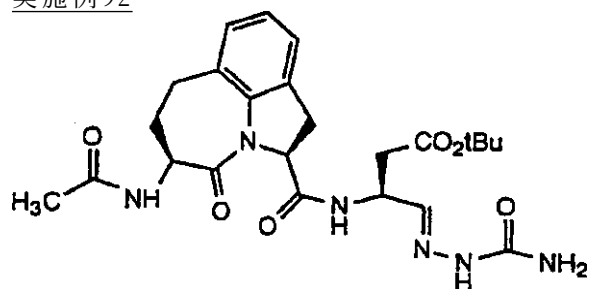


(2S-cis)-[5-ジヒドロシンナミルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸

(2S-cis)-[5-ジヒドロシンナミルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン (0.181 g, 約0.320mmol)を、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒドの3:1:1溶液(2 ml)で処理し、そして得られた混合物を窒素下で4時間攪拌した。次いで、反応混合物を水で希釈し、エバポレートしてメタノールを除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。逆相ゲル(MCIゲル、CHP-20P、75-150ミクロン)上でのフラッシュクロマトグラフィー(10%~80%メタノール-水グラジエントを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、凍結乾燥後、白色固体として0.075gの表題の化合物(47%)を得た；m.p. 78-81°C。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) Rf=0.45。

¹H-NMR (300 MHz, DMSO d₆): δ 8.58 (m, 1H), 8.30 (d, J= 7.5 Hz, 1H), 7.24 (m, 5H), 7.08 (m, 2H), 6.99 (m, 1H), 5.04 (d, J=9.3 Hz, 1H), 4.39 (m, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.46 (m, 1H), 3.05 (m, 2H), 2.93 (d, J= 16.8 Hz, 2H), 2.83 (m, 2H), 2.00 (d, J= 5.1 Hz, 2H). 質量 スペクトル : m/z 478 (M+H).

実施例 92



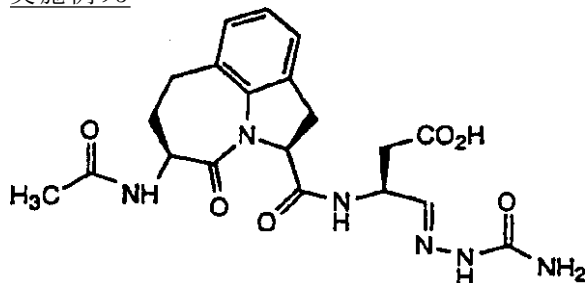
(2S-cis)-[5-アセトアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン

ピリジン(3 ml)中の(2S-cis)-[5-アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン(0.222g, 0.490mmol)の溶液に、室温で窒素下で無水酢酸(0.07mL, 0.735mmol)を添加した。一晩攪拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートして泡状物質を得た。これを酢酸エチル中に取り、そして5%硫酸水素カリウム溶液および飽和塩化ナトリウム溶液で連続的に洗浄し；乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートして、灰白色固体として0.130gの表題の化合物(53%)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) Rf=0.55。

¹H-

NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 8.75 (s, 1H), 7.75 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 7.08 (m, 1H), 7.01 (m, 2H), 6.87 (d, J=6.3 Hz, 1H), 5.25 (d, J= 8.1 Hz, 1H), 4.84 (m, 1H), 4.52 (m, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.28 (m, 2H), 3.02 (m, 1H), 2.55 & 2.46 (AB, dd, J= 4.2, 7.1, 15.7 Hz, 2H), 2.36 (m, 1H), 2.18 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.31 (s, 9H).

実施例 93



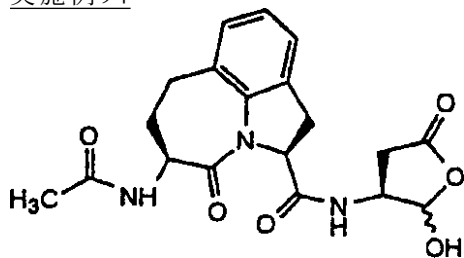
10

(2S-cis)-[5-アセチルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

塩化メチレン(1 ml)中の (2S-cis)-[5-アセチルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸 tert-ブチルエステルセミカルバゾン(0.112g, 0.224mmol)の溶液に、アニソール(0.5mL)、次いでトリフルオロ酢酸(1 ml)を添加した。窒素下室温で2.5時間攪拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンで2度チェイス(chase)して表題の化合物(0.117g)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) R_f=0.15。質量スペクトル：m/z445(M+H)。

20

実施例 94



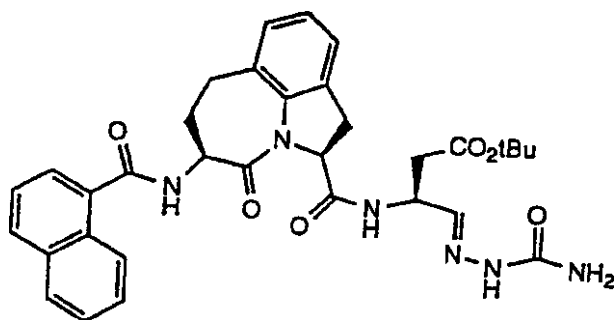
30

(2S-cis)-[5-アセチルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸

(2S-cis)-[5-アセチルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン(0.115g, 約0.224mmol)を、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒドの3:1:1溶液(2 ml)で処理し、そして得られた混合物を窒素下で5時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、エバポレートしてメタノールを除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。逆相ゲル(MCIゲル、CHP-20P、75-150ミクロン)上でのフラッシュクロマトグラフィー(10%~80%メタノール-水グラジエントを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、凍結乾燥後、白色固体として0.044gの表題の化合物(51%)を得た；m.p. 210-215°C(分解)。TLC(塩化メチレン-メタノール-酢酸、44:5:1) R_f=0.45。質量スペクトル：m/z388(M+H)。

40

実施例 95



(2S-cis)-[5-(1-ナフトイル)アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン

10

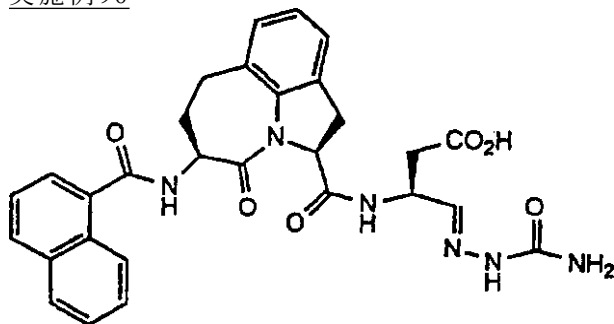
塩化メチレン(1.5ml)中の1-ナフトレンカルボン酸(0.072g, 0.417mmol)の溶液に窒素下0℃で撹拌しながら1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.077g, 0.501mmol)および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(0.120g, 0.626mmol)を添加した。15分後、塩化メチレン(2 mL)中の(2S-cis)-[5-アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン(0.189g, 0.147mmol)の溶液を添加し、そして反応を1時間以内に室温にした。全体で5時間の撹拌の後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウム溶液および飽和塩化ナトリウム溶液で連続的に洗浄し；乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートした。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(5%メタノール-塩化メチレンを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、灰白色固体として0.168gの表題の化合物(66%)を得た；m.p. 103-105℃(分解)。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) Rf=0.6。質量スペクトル：m/z613(M+H)。

20

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.09 (bs, 1H), 8.38 (d, J=8.4 Hz, 1H), 7.82-7.93 (m, 3H), 7.70 (d, J=6.3 Hz, 1H), 7.45-7.58 (m, 3H), 7.37 (d, J=6.6 Hz, 1H), 7.06-7.15 (m, 4H), 5.30 (d, J= 8.4 Hz, 1H), 4.80-4.85 (m, 2H), 3.57 (d, J= 3.6 Hz, 1H), 3.30-3.45 (m, 2H), 3.16 (m, 1H), 2.59-2.65 (m, 2H), 2.27-2.49 (m, 2H), 1.29 (s, 9H)。

30

実施例96

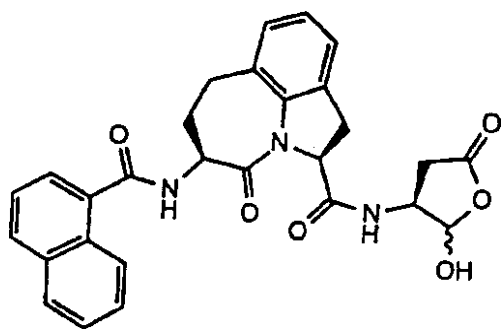


(2S-cis)-[5-(1-ナフトイル)アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

40

塩化メチレン(1 mL)中の(2S-cis)-[5-(1-ナフトイル)アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン(0.106g, 0.173mmol)の溶液に、アニソール(0.5mL)、次いでトリフルオロ酢酸(1 mL)を添加した。窒素下室温で3時間撹拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンで2度チェイスして表題の化合物(0.110g)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) Rf=0.3。

実施例97



(2S-cis)-[5-(1-ナフトイル)アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸

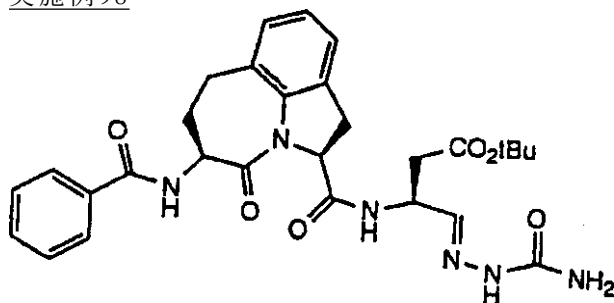
10

(2S-cis)-[5-(1-ナフトイル)アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン(0.110g, 約0.173mmol)を、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒドの3:1:1溶液(3ml)で処理し、そして得られた混合物を窒素下で5時間攪拌した。次いで、反応混合物を水で希釈し、エバポレートしてメタノールを除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(5%-20%メタノール-塩化メチレングラジエントを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、白色固体として0.076gの表題の化合物(86%)を得た；m.p. 202-203°C(分解)。TLC(塩化メチレン-メタノール-酢酸、20:1:1) Rf=0.3。質量スペクトル：m/z498(M-H)。

20

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 9.38 (bs, 1H), 8.94 (m, 1H), 8.56 (m, 1H), 8.36 (m, 1H), 7.94-8.02 (m, 2H), 7.68 (d, J=6.9 Hz, 1H), 7.51-7.59 (m, 3H), 7.07-7.13 (m, 2H), 6.97 (m, 1H), 5.20 (d, J= 10.5, 1Hz), 4.67 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.49 (m, 1H), 2.95-3.23 (m, 2H), 2.53 (m, 1H), 2.22-2.34 (m, 2H).

実施例98



30

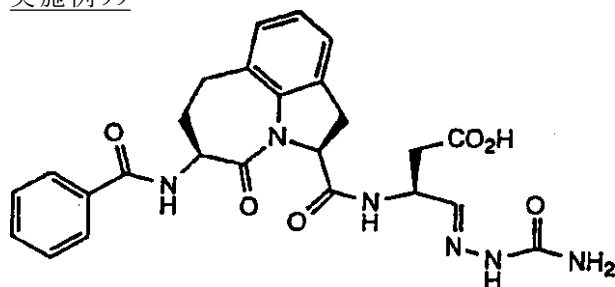
(2S-cis)-[5-ベンゾイルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン

塩化メチレン(2.5ml)中の(2S-cis)-[5-アミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン(0.121g, 0.264mmol)の溶液に、0°C窒素下で攪拌しながらトリエチルアミン(0.055mL, 0.396mmol)、次いで塩化ベンゾイル(0.037mL, 0.317mmol)を添加した。室温、窒素下で1時間攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウム溶液、飽和重炭酸ナトリウム溶液および飽和塩化ナトリウム溶液で連続的に洗浄し；乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートした。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(10%ヘキサン-酢酸エチル、100%酢酸エチル、次いで10%メタノール-酢酸エチルを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、灰白色固体として0.073gの表題の化合物(49%)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) Rf=0.7。質量スペクトル：m/z563(M+H)。

40

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 8.61 (bs, 1H), 7.83-7.86 (m, 2H), 7.47-7.53 (m, 3H), 7.06-7.12 (m, 3H), 5.30 (dd, $J=2.2, 7.8$ Hz, 1H), 4.89 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 3.60 (d, $J=16.5$ Hz, 1H), 3.36 (m, 1H), 3.19 (m, 1H), 2.69 (dd, $J=4.4, 11.7$ Hz, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.29 (m, 1H), 1.34 (s, 9H).

実施例99



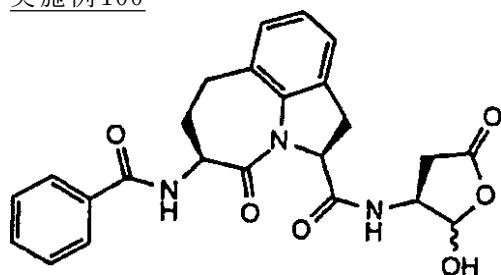
10

(2S-cis)-[5-ベンゾイルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

塩化メチレン (1 mL) 中の (2S-cis)-[5-ベンゾイルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸 tert-ブチルエステルセミカルバゾン (0.064g, 0.114mmol) の溶液に、アニソール (0.5mL)、次いでトリフルオロ酢酸 (1 mL) を添加した。窒素下室温で2.5時間攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そしてエバポレートして表題の化合物 (0.070g) を得た。TLC (塩化メチレン-メタノール、4:1) $R_f=0.4$ 。質量スペクトル: m/z 507 (M+H)。

20

実施例100



30

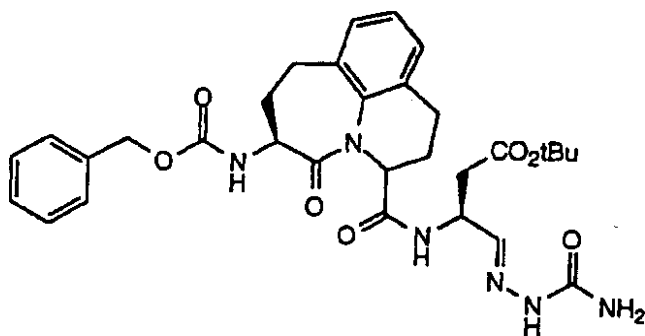
(2S-cis)-[5-ベンゾイルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸

(2S-cis)-[5-ベンゾイルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン (0.070g, 約0.114mmol) を、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒドの3:1:1溶液 (3 mL) で処理し、そして得られた混合物を窒素下で3.5時間攪拌した。次いで、反応混合物を水で希釈し、エバポレートしてメタノールを除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。シリカゲル (S/Pブランドシリカゲル 60 Å、230-400メッシュ ASTM) 上でのフラッシュクロマトグラフィー (10 および 20% メタノール-塩化メチレンを用いて溶出する) により粗生成物を精製し、白色固体として 0.042g の表題の化合物 (82%) を得た; m.p. 204-205°C (分解)。TLC (塩化メチレン-メタノール、4:1) $R_f=0.4$ 。質量スペクトル: m/z 448 (M-H)。

40

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 8.84 (m, 1H), 8.53 (m, 1H), 7.91-7.95 (m, 2H), 7.46-7.58 (m, 3H), 7.11 (m, 2H), 6.99 (t, $J=7.3$ Hz, 1H), 5.14 (d, 10.2 Hz, 1H), 4.62 (m, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.48 (m, 1H), 3.12-3.18 (m, 2H), 2.99 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.12-2.46 (m, 3H).

実施例101



(3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン

1. (3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボン酸, メチルエステルの調製

塩化メチレン(6 mL)中の(3R,S-cis)-6-アミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボン酸, メチルエステル(0.570g, 2.1mmol, Tetrahedron Letters 36, 1593-1596頁(1995)および米国特許第5,504,080号(1996年4月2日)に記載されるように調製される)の溶液に、ベンジルククロホルメート(0.6mL, 4.2mmol)およびトリエチルアミン(1.2mL, 8.4mmol)を添加し、そして得られた混合物を窒素下で30分間攪拌した。反応を水でクエンチし、次いで酢酸エチルと5%硫酸水素カリウム水溶液との間に分配した。水層を酢酸エチルで2度抽出し、次いで合わせた有機層を飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートした。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(酢酸エチル-ヘキサン(2:1)を用いて溶出する)により粗生成物を精製し、白色泡状物質として0.643gの表題の化合物(76%)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール、95:5) Rf=0.8。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.36-7.25 (m, 5H), 7.13-7.02 (m, 3H), 5.67 (d, J=7.8 Hz, 1H), 5.02 (t, J=9.15, 18.3 Hz, 2H), 4.34 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 3.16 (m, 1H), 2.69-2.56 (m, 5H), 2.06 (m, 1H). 質量スペクトル: m/z 408 (M+H).

2. (3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボン酸の調製

1,4-ジオキサン(10.5mL)および水(3.5mL)中の(3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボン酸, メチルエステル(0.622g, 1.53mmol)の溶液に、1M水性水酸化リチウム(2.3mL, 2.3mmol)を添加し、そして得られた混合物を窒素下室温で1時間攪拌した。反応混合物を5%硫酸水素カリウム水溶液を用いて約pH2まで酸性化し、次いで酢酸エチルと飽和塩化ナトリウム水溶液との間に分配した。水層を酢酸エチルで2度抽出し、そして合わせた有機層を乾燥(硫酸ナトリウム)させ、そしてエバポレートして表題の化合物を得た(0.670g)。TLC(塩化メチレン-メタノール-酢酸、32:1:1) Rf=0.35。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.38-7.28 (m, 5H), 7.13-7.04 (m, 3H), 5.72 (d, J=8.1 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 4.35 (m, 1H), 3.77-3.67(m, 5H), 3.10 (m, 1H), 2.72-2.52 (m, 5H), 2.07 (m, 1H), 1.70 (m, 1H).

3. (3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン

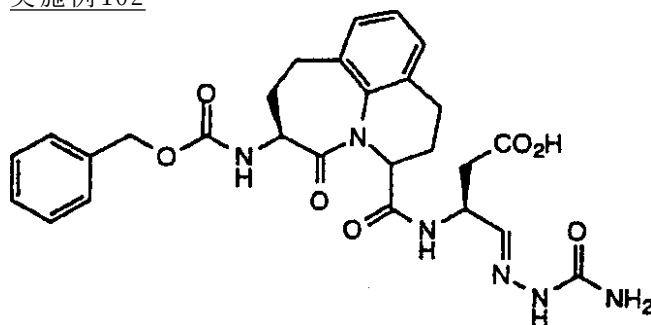
塩化メチレン(12mL)中の(3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボン酸(0.604g, 1.5mmol)の溶液に、窒素下0℃で攪拌しながら1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.282g,

1.8mmol)および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(0.442g, 3mmol)を添加した。15分後、L-アスパラギン酸セミカルバゾンβ-tert-ブチルエステル、p-トルエンスルホネート塩(0.60g, 1.5mmol)およびN-メチルモルホリン(0.25mL, 3mmol)を添加し、混合物を1時間以内に室温まで上昇させた。さらなる時間攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウムおよび飽和塩化ナトリウム溶液で連続的に洗浄し；乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートした。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(10%メタノール-塩化メチレンを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、白色泡状物質として0.523gの標題の化合物(56%)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) Rf=0.65。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ

9.89 (m, 1H), 7.72 (m, 1H), 7.92 (d, J=9 Hz, 1H), 7.65 (d, J=8.1 Hz, 1H), 7.32-7.28 (m, 5H), 7.12 (s, 1H), 7.07 (d, J=5.7 Hz, 2H), 6.03 (d, J=7.5 Hz, 1H), 5.84 (d, J=8.1 Hz, 1H), 5.03 (s, 2H), 5.01 (m, 1H) 4.80 (m, 1H), 4.31 (m, 1H), 2.98 (m, 1H), 2.75-2.41 (m, 7H), 2.12 (m, 1H), 1.77 (m, 1H), 1.39 (s, 9H).

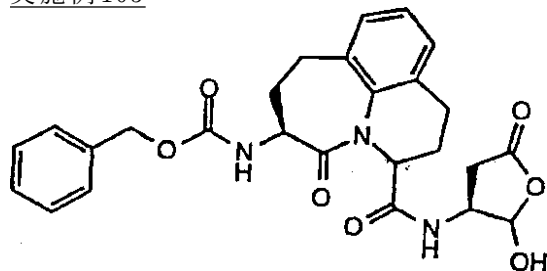
実施例102



(3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン

塩化メチレン(1 mL)中の(3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸tert-ブチルエステルセミカルバゾン(0.200g, 0.33mmol)の溶液に、アニソール(0.5mL, 4.62mmol)、次いでトリフルオロ酢酸(1 mL)を添加した。窒素下室温で1.5時間攪拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンで2度共沸させて表題の化合物(0.248g)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール-酢酸、8:1:1) Rf=0.2。質量スペクトル：m/z549[M-H]⁻。

実施例103



(3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸

(3R,S-cis)-6-ベンジルオキシカルボニルアミノ-5-オキソ-2,3,4,5,6,7,8-ヘキサヒドロ-1H-アゼピノ[3,2,1-hi]キノリン-3-カルボニル)-アミノ]-4-オキソ-ブタン酸セミカルバゾン(0.245g, 約0.33mmol)を、メタノール-酢酸-37%ホルムアルデヒドの3:1:1溶液(3 ml

10

20

30

40

50

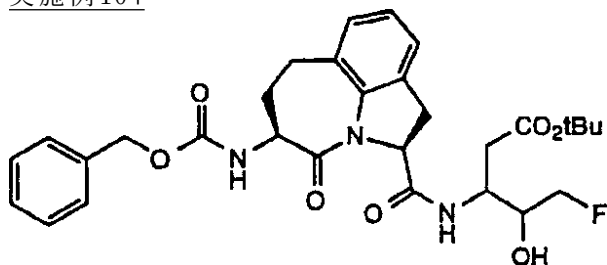
)で処理し、そして得られた混合物を窒素下で1.5時間攪拌した。反応混合物を水で希釈し、エバポレートしてメタノールを除去し、次いで残った混合物を凍結乾燥した。逆相ゲル(MCIゲル、CHP-20P、75-150ミクロン)上でのフラッシュクロマトグラフィー(10%~80%メタノール-水グラジエントを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、凍結乾燥後、白色固体として0.090gの表題の化合物(60%)を得た；m.p. 120-123°C(分解)。TLC(塩化メチレン-メタノール-酢酸、32:1:1) Rf=0.45。

¹H-NMR (300 MHz,

DMSO d6): δ 8.67 (m, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.37-7.27 (m, 5H), 7.17-7.08 (m, 3H), 5.44 (m, 1H), 4.95 (s, 2H), 4.70 (m, 1H), 4.07 (m, 1H), 3.92 (m, 1H), 3.16 (m, 1H), 2.98 (m, 1H), 2.75-2.41 (m, 7H), 2.25 (m, 1H), 2.11 (m, 1H), 1.29 (m, 1H). 質量スペクトル : m/z 492 [M-H]⁺.

10

実施例104



20

3{[(2S-cis)-5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]}-5-フルオロ-4-ヒドロキシ-ペンタン酸tert-ブチルエステル

塩化メチレン(3 mL)中の(2S-cis)-5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボン酸(0.373g, 0.98mmol)の溶液に、窒素下0°Cで攪拌しながら1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.151g, 0.98mmol)および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(0.283g, 1.47mmol)を添加した。15分後、3-アミノ-4-ヒドロキシ-5-フルオロペンタン酸, tert-ブチルエステル(0.204g, 0.98mmol, Tetrahedron Letters 35, 9693-9696頁(1994)に記載されるように調製される)の溶液を添加し、そして混合物を1時間以内に室温にした。一晩攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウムおよび飽和塩化ナトリウム溶液で連続的に洗浄し；乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートした。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(2%メタノール-塩化メチレンを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、白色泡状物質として0.383gの表題の化合物(68%)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) Rf=0.6。

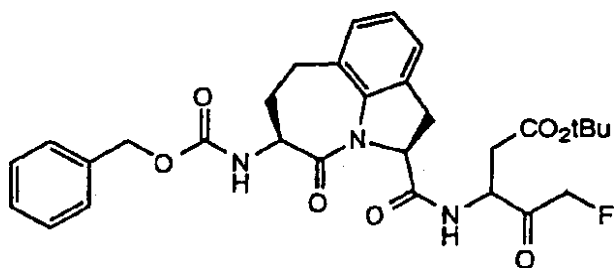
30

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.45-7.31(m, 5H), 7.08-

7.01 (m, 3H), 6.10 (m, 1H), 5.26 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.52 (m, 1H), 4.38-4.30 (m, 2H), 4.21-4.19 (m, 2H), 4.03-3.95 (m, 2H), 3.43-3.20 (m, 4H), 3.13 (m, 2H), 2.62-2.50 (m, 2H), 2.42 (m, 1H), 1.42 (s, 4H), 1.32 (s, 5H). 質量スペクトル : m/z 570 (M+H).

40

実施例105



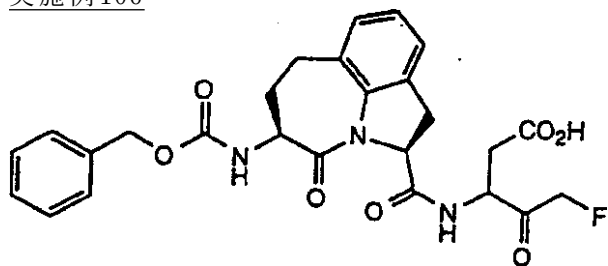
3{(2S-cis)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]}-5-フルオロ-4-オキソ-ペンタン酸tert-ブチルエステル

メチルスルホキシド(1.3mL)中の3{(2S-cis)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]}-5-フルオロ-4-ヒドロキシ-ペンタン酸tert-ブチルエステル(0.114g, 0.20mmol)の溶液に、Dess-Martin過ヨウ素化物(periodinane)(0.228g)を添加した。窒素下室温で2時間攪拌した後、さらなる部分のDess-Martin過ヨウ素化物(0.135g)を添加し、次いで2.5時間後に第3の部分(0.10g)を添加した。反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして水および飽和塩化ナトリウム溶液で2度洗浄し；乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートした。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(1/1酢酸エチル-ヘキサンを用いて溶出する)により粗生成物を精製し、白色泡状物質として0.076gの表題の化合物(67%)を得た。TLC(酢酸エチル-ヘキサン、1:1) Rf=0.6。

¹H-NMR

(300 MHz, CDCl₃): δ 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.34-7.30 (m, 5H), 7.07-6.99 (m, 3H), 6.06 (m, 1H), 5.23 (d, J = 12.3 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.53 (d, J = 13.2 Hz, 1H), 4.77 (d, J = 9.9 Hz, 2H), 4.32 (m, 1H), 3.44 (dd, J = 5, 8.4 Hz, 1H), 3.32-3.21 (m, 2H), 3.06 (m, 1H), 2.9 (m, 1H), 2.62 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 2.17 (m, 1H), 1.39 (s, 4H), 1.29 (s, 5H).

実施例106



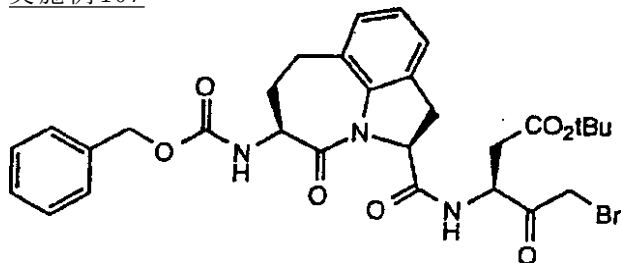
3{(2S-cis)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]}-5-フルオロ-4-オキソ-ペンタン酸

塩化メチレン(1.0mL)中の3{(2S-cis)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル)-アミノ]}-5-フルオロ-4-オキソ-ペンタン酸tert-ブチルエステル(0.063g, 0.111mmol)の溶液に、アニソール(0.5mL)、次いでトリフルオロ酢酸(1.0mL)を添加した。窒素下室温で2時間攪拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンで2度チェイスした。粗製残渣をエチルエーテルで粉末化して表題の生成物(0.030g)を白色個体として得た；m.p. 106-107°C(分解)。TLC(塩化メチレン-メタノール-酢酸、32:1:1) Rf=0.3。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃):

δ 7.61 (m, 1H), 7.32 (s, 5H), 7.1(d, J = 4 Hz, 1H), 7.03 (d, J = 4 Hz, 2H), 6.17 (m, 1H), 5.22 (m, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.75-4.70 (m, 2H), 4.32 (m, 1H), 3.5 (m, 1H), 3.31-3.15 (m, 2H), 3.03 (m, 1H), 2.93 (m, 1H), 2.69 (m, 1H), 2.36 (m, 1H), 2.12 (m, 1H). 質量スペクトル : m/z 512 (M+H).

実施例107



3{(2S-cis)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル]-アミノ}-5-ブromo-4-オキソ-ペンタン酸tert-ブチルエステル

塩化メチレン(5.5mL)中の(2S-cis)-5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボン酸(0.302g, 0.797mmol)の溶液に、窒素下0℃で攪拌しながら1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物(0.146g, 0.96mmol)および1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミドヒドロクロリド(0.230g, 1.2mmol)を添加した。15分後、アスパラギン酸、α-メチル、β-tert-ブチルジエステルヒドロクロリド(0.191g, 0.797mmol)、次いでN-メチルモルホリン(0.13mL, 1.2mmol)を添加し、そしてこの混合物を1時間以内に室温にした。一晩攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、そして5%硫酸水素カリウムおよび飽和塩化ナトリウム溶液で連続的に洗浄し；乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートした。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(酢酸エチル-ヘキサン(1:1)を用いて溶出する)により粗生成物を精製し、白色固体として0.350gのN-[(2S-cis)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル]]アスパラギン酸、α-メチル、β-tert-ブチルジエステル(87%)を得た。TLC(塩化メチレン-メタノール、9:1) R_f = 0.8。m.p. 147-148℃(分解)。

¹H-NMR(300

MHz, CDCl₃): δ 7.48 (d, J=7.5 Hz, 1H), 7.34-7.29 (m, 5H), 7.07 (m, 1H), 7.03-6.96 (m, 2H), 6.15 (d, J=5.7 Hz, 1H), 5.28 (d, J=7.8 Hz 1H), 5.11 (s, 2H), 4.72 (m, 1H), 4.32 (m, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.49 (d, J=16.5 Hz, 1H), 3.31-3.20 (m, 2H), 3.05 (m, 1H), 2.72 (ABX, dd, J=4.65, 15, 64.5 Hz, 2H), 2.43 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.30 (s, 9H).

1,4-ジオキサン(4.5mL)および水(1.5mL)中の上記生成物(0.330g, 0.585mmol)の溶液に、1M水性水酸化リチウム(0.7mL, 0.702mmol)を添加し、そして得られた混合物を窒素下室温で30分間攪拌した。反応混合物を0.1N HCl溶液を用いて約pH3まで酸性化し、次いで酢酸エチルと飽和塩化ナトリウム溶液との間に分配した。水層を酢酸エチルで2度抽出し、そして合わせた有機層を乾燥(硫酸ナトリウム)させ、そしてエバポレートして、白色泡状物質として0.275g(85%)のN-[(2S-cis)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-hi]インドール-2-カルボニル]]アスパラギン酸、β-tert-ブチルジエステルを得た。TLC(塩化メチレン-メタノール-酢酸、9:1) R_f = 0.25。

¹H-NMR(300

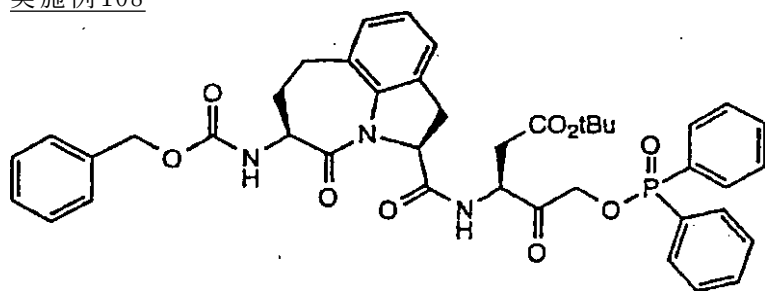
MHz, CDCl₃): d 7.57 (d, J=7.8 Hz, 1H), d7.35-7.29 (m, 5H), 7.08 (m, 1H), 7.03-6.98 (m, 2H), 6.24 (d, J=6 Hz, 1H), 5.28 (d, J=5.1 Hz 1H), 5.11 (s, 2H), 4.73 (m, 1H), 4.35 (m, 1H), 3.48 (d, J=16.8 Hz, 1H), 3.36-3.20 (m, 2H), 3.07 (m, 1H), 2.76 (ABX, dd, J=4.8, 18, 66 Hz, 2H), 2.40 (m, 1H), 2.19 (m, 1H), 1.33 (s, 9H).

テトラヒドロフラン(3.0mL)中の上記生成物(0.262g, 0.475mmol)の溶液に、窒素下-10℃で攪拌しながら、N-メチルモルホリン(0.114mL, 1.05mmol)を添加し、次いでイソブチルクロロホルメート(0.107mL, 0.81mmol)を滴下した。40分後、反応混合物をろ過し、この塩を乾燥THFで洗浄し、そしてろ液を0℃に冷却した。これを新たに調製したジアゾメタン(過剰)のエーテルの(ethereal)溶液で処理した。混合物を0℃で30分間攪拌した後、臭化水素酸(48重量%水溶液)/酢酸(1.3mL, 1/1)の混合物を滴下した。さらに10分間攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、次いで飽和重炭酸ナトリウムおよび飽和塩化ナトリウム溶液で連続的に洗浄し；乾燥(硫酸ナトリウム)し、そして乾燥するまでエバポレートした。シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230-400メッシュASTM)上でのフラッシュクロマトグラフィー(酢酸エチル-ヘキサン(1:1)を用いて溶出する)により粗生成物を精製し、白色泡状物質として0.200gの表題の化合物(67%)を得た。TLC(酢酸エチル-ヘキサン、1:1) R_f=0.7。

¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃): δ 7.71

(d, J=9 Hz, 1H), d7.35-7.30 (m, 5H), 7.09 (m, 1H), 7.04-7.02 (m, 2H), 6.1 (d, J=5.4 Hz, 1H), 5.28 (d, J=7.2 Hz 1H), 5.12 (s, 2H), 4.89 (dd, J=4.5, 15 Hz 1H), 4.35 (m, 1H), 4.16 (s, 2H), 3.50-3.21(m, 3H), 3.06 (m, 1H), 2.76 (ABX, dd, J=4.65, 18, 103 Hz, 2H), 2.37 (m, 1H), 2.15 (m, 1H), 1.27 (s, 9H). 質量スペクトル: m/z 626/628 (M-H).

実施例108

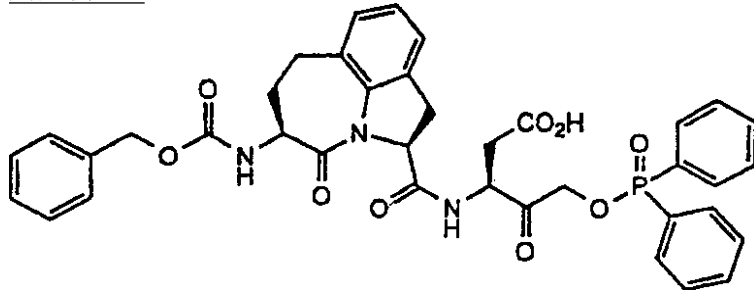


3-[(2S-シス)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-ハイ(hi)]インドール-2-カルボニル]アミノ]-5-(ジフェニルホスフィニル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸、tert-ブチルエステル

3-[(2S-シス)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-ハイ(hi)]インドール-2-カルボニル]アミノ]-5-ブromo-4-オキソ-ペンタン酸、tert-ブチルエステル(0.069g, 0.110mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(1.0mL)溶液に、フッ化カリウム(0.029g, 0.495mmol)を添加し、続いてジフェニルホスフィン酸(0.029g, 0.139mmol)を添加した。室温下において、窒素下で48時間攪拌した後、反応混合物を酢酸エチルで希釈し、次いで重炭酸ナトリウム希薄溶液、次いで水で連続的に洗浄した。乾燥(硫酸ナトリウム)し、そしてエバポレートして乾燥させた。粗生成物を、シリカゲル(S/Pブランドシリカゲル60Å、230~400メッシュASTM)上のフラッシュクロマトグラフィー(酢酸エチル-ヘキサン(1:1)で溶離する)により精製し、0.048g(59%)の表題化合物を、透明なオイルとして得た。TLC(酢酸エチル-ヘキサン、2:1)、R_f=0.3。

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): δ 7.89-7.80 (m, 4H), 7.52-7.30 (m, 11H), 7.06 (m, 1H), 7.01-6.96 (m, 2H), 6.45 (m, 1H), 5.21 (m, 1H), 5.13 (s, 2H), 4.96 (dd, $J=8.3$, 18 Hz, 1H), 4.78-4.70 (m, 2H), 4.35 (m, 1H), 3.35-3.23 (m, 3H), 3.05 (m, 1H), 2.76 (ABX, dd, $J=4.65$, 18, 103 Hz, 2H), 2.43(m, 1H), 2.18 (m, 1H), 1.33 (s, 9H).

実施例109



3-[(2S-シス)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-ハイ(hi)]インドール-2-カルボニル]アミノ]-5-(ジフェニルホスフィニル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸

3-[(2S-シス)-[5-ベンジルオキシカルボニルアミノ-1,2,3,4,5,6,7-ヘキサヒドロ-4-オキソアゼピノ[3,2,1-ハイ(hi)]インドール-2-カルボニル]アミノ]-5-(ジフェニルホスフィニル)オキシ-4-オキソ-ペンタン酸 tert-ブチルエステル (0.040g, 0.054mmol) 塩化メチレン (1.0mL) 溶液に、アニソール (0.5mL) を添加し、続いてトリフルオロ酢酸 (1.0mL) を添加した。室温において窒素下で30分撹拌した後、反応混合物を塩化メチレンで希釈し、そしてエバポレートし、次いで塩化メチレンと共に2回共沸させた。粗製残渣をエチルエーテルで粉末化 (trituate) して、0.030gの表題化合物を、白色固体として得た。融点: 109~111°C (dec)。TLC (塩化メチレン-メタノール、9:1)。 $R_f=0.4$ 。

$^1\text{H-NMR}$ (300 Mhz, CDCl_3): δ 7.87-7.66 (m, 4H), 7.60-7.28 (m, 11H), 7.05-6.95 (m, 3H), 6.84 (m, 1H), 5.12(s, 2H), 5.05 (m, 1H), 4.58 (m, 1H), 4.42-4.15 (m, 4H), 3.35-3.10 (m, 4H), 3.05 (m, 1H), 2.76 (m, 1H), 2.56 (m, 1H), 2.37(m, 1H), 2.13 (m, 1H), 1.93 (bs, 1H). 質量スペクトル: m/z 710 (M+H).

実施例110

ICE/CED-3インヒビターが顆粒球好中球に及ぼす影響の評価のための材料および方法
好中球単離

酸クエン酸デキストロース (ACD) で抗凝血化された全血 (1:5のACD-血液比を有する) を回収した (約100ml)。

ポリプロピレンプラスチック容器を用いて、好中球を以下のように単離した:

30mlの全血を、6%デキストラン (生理食塩水中) を15ml含む50mlポリプロピレン遠心分離管に添加する。血液を、約1時間、室温にて沈降させる。

シリンダの頂部から収集した、濁った麦わら色の (straw colored) 層を、50mlの円錐状ポリプロピレン管に入れる。血液細胞を、4°Cにて、ブレーキを低速にして (brake on low) 240×g (Sorvall遠心分離 (120rpmにて)) で12分間遠心分離して、ペレット化した。

上清を吸引し、そしてプールしたペレットを、40~50mlの冷却したPBS (w/o, Ca, Mg) 中で再懸濁させ、そして240×g (Sorvall遠心分離 (1200rpmにて)) で、4°Cにて、ブレーキを高速にして (brake on high)、6分間遠心分離した。

上清を吸引し、そしてプールしたペレットを、12mlの冷却した細胞培養グレードの水中で

再懸濁させた。懸濁物を、ピペットを用いて穏やかに30秒間滴定し (titriate)、次いで4 mlの冷却した0.6M KClを添加した。(冷却したPBS (w/o、Ca、Mg)を用いて50mlとし、次いで、4℃にて、ブレーキを高速にして、300×gで6分間遠心分離 (Sorvall遠心分離 (1400rpmにて))した。

上記を1回繰り返した。

上清を吸引し、そして細胞を、2.5mlの冷却したPBS (w/o、Ca、Mg)中に再懸濁させた。細胞懸濁物を、15mlのポリプロピレン円錐状管中で、3 mlのFicoll-Hypaque上に層形成 (layer)させ、次いで、4℃にて、ブレーキを低速にして、400×gで30分間遠心分離 (Sorvall遠心分離 (1900rpmにて))した。

吸引された懸濁液を、減少させて好中球ペレットにした。このペレットを、冷却したPBS (w/o、Ca、Mg)中に再懸濁させ、そして50mlの円錐状管に移し、そして冷却したPBS (w/o、Ca、Mg)を用いて50mlとし、そして、4℃にて、ブレーキを高速にして、300×gで6分間遠心分離 (Sorvall遠心分離 (1400rpmにて))した。

上清を吸引し、そして好中球ペレットを冷却した50mlのPBS (w/o、Ca、Mg)中に再懸濁させ、そして、4℃にて、ブレーキを高速にして、300×gで6分間遠心分離 (Sorvall遠心分離 (1400rpmにて))した。

上清を吸引し、そして好中球ペレットを、氷上で、4.0mlの冷却したPBS (w/o、Ca、Mg)中に再懸濁させた。10 μlの好中球懸濁液を、990 μlのトリパンブルー (Trypan blue) (1:100)で希釈し、そして血球計を用いて細胞をカウントした。細胞の数および生存率を決定した。

好中球培養条件:

培養培地は、以下の通りであった:

(RPMI 1640; 10% FBS; 10mM Hepes; 0.2mM L-グルタミン; 25U/mlペニシリン; および25mg/mlストレプトマイシン)

精製した好中球の維持を、以下の条件下で実行した:

(上記培養培地中、 5×10^6 細胞/ml; ポリスチレン丸底96ウェルプレート; 250 μl/ウェル; および37℃、5% CO₂/95%大気で加湿したインキュベーター) (Lilesら、Blood 119 (1995) 3181-3188)。

フローサイトメトリーによる、低2倍体核 (nuclei) の分析

低浸透圧性蛍光色素溶液

(50 μg/mlプロピジウムヨージド (Sigma catalog番号P4170); 0.1% Triton X-100; および0.1%クエン酸ナトリウム)。

好中球を、4℃にてペレット化し、そして上清を吸引した。

好中球を、 5×10^6 細胞/mlの密度で、低浸透圧性蛍光色素溶液中に再懸濁させた。個々の核のプロピジウムヨージド蛍光を、FL2において評価し、そして前方および側方散乱における物理的パラメータをゲートオン (gate on)しながら、対数スケールで測定し、細胞デブリーを排除した。

サンプルあたり少なくとも10,000事象 (event)を回収し、そして結果を、非アポトーシス性好中球個体群に対して評価した。(Lilesら、Blood 119(1995)3181~3188)。

化学発光により測定された、単離された好中球におけるレスプレイトリーバースト

酸クエン酸デキストロース (ACD)で抗凝血化した全血 (ACDと血液の比1:5を有する)を回収した (150ml)。

好中球を、上記の通り単離した。

125mgのザイモサン粒子を、25mlのプールしたヒト血清 (5 mg/ml)中に懸濁してオプソニン化したザイモサンを調製し、そしてこれを37℃にて20分間インキュベートした。この懸濁液を遠心分離し、そして粒子を7 ml中のPBS (18mg/ml)中に再懸濁させ、そして使用するまで氷上で貯蔵した (ピペッティングの前に攪拌する)。

Lucigenin (分子量510.5)の250 μM溶液50mlを、6.4mgの固体を50mlのPBS-G (+Ca、Mg)に溶解させることにより調製した。10 μlのPBS-G (+Ca、Mg)を、白色96ウェルプレート中のウェルに入れた。

10

20

30

40

50

Lucigeninの250 μ M溶液50 μ lを、白色96ウェルプレート中のウェルに添加した。
細胞調製物を、PBS-G (+Ca、Mg) を用いて、細胞培養物 (時間 0 における濃度 = 5.0×10^6 細胞/ml) から得た。

20 μ lの好中球懸濁液を、適切なウェル中に懸濁させ、そしてプレートを、37°Cで3分間インキュベートした。10 μ lのオプソニン化ザイモサンを、ウェルに添加した。

プレートを、動力学モードにおいて37°Cにて14分間、照度計 (Labsystems Luminoskan, Needham Heights, MA) 上で読みとり、そして結果をソフトウェア (DeltaSoft) を用いて記録した。

全血アッセイ：

以下の試薬を用いた：

10

抗-CD32-FITCモノクローナル抗体 (Pharmingenより入手)

溶解溶液 (10 $\times$ Stock : 89.9g NH₄Cl ;

10.0g KHC0 ;

0.37g EDTA四ナトリウム ;

1 リットルのdH₂O中に溶解する。pH7.3に調整する。密閉したボトル中で、4 °Cにて保存する。(使用の前に、dH₂Oを用いて1 : 10に希釈する。)

(カルシウムまたはマグネシウムを含まないDPBSは、Irvine Scientificから入手した。DPBS中の2 %ウシ胎児血清アルブミンを、4 °Cにて保存した。DPBS中の50 μ g/mlプロピジウムヨージドを滅菌濾過し、そして4 °Cにて保存した。)

以下のプロトコルに従った：

20

200 μ lの血液サンプル/2.8ml 1 X 溶解溶液を、15mlのポリプロピレン円錐状管に入れる。キャップをして反転させ、混合する。室温で3 ~ 5分間放置する。

卓上Sorvall (1200rpm) 中で、4 °Cにて5分間遠心分離する。

上清を吸引する。ペレットを、200 μ l/サンプル2 % FBS/DPBS中で再懸濁させる。20 μ l/サンプルに抗-CD32-FITCを添加する。暗所にて、氷上で30分間インキュベートする。

5 ml/サンプルDPBSを添加する。4 °Cにて5分間、1000rpmで遠心分離する。

上清を吸引する。ペレットを、1 ml/サンプル2 % FBS/DPBS中に再懸濁させる。

3 ml/サンプルを、穏やかに攪拌している氷冷95% EtOHに滴下する。

サンプルを、暗所にて、氷上で30分間インキュベートする。

1000rpmで、4 °Cにて5分間遠心分離する。

30

各サンプルを、50 μ lの5 mg/ml RNA分解酵素中に再懸濁させる。サンプルを、12 $\times$ 75mm Falconポリスチレン管中の50 μ g/mlプロピジウムヨージドの900 μ l/サンプルに移す。

氷上で、30分間インキュベートする。

サンプルを、フローサイトメトリー (アルゴンレーザー) にて、前方および側方散乱ならびに蛍光について分析する。

実施例111

ICE/ced-3インヒビターのエキスピボ適用による、好中球/顆粒球生存の増強

本発明は、好中球/顆粒球のエキスピボ生存を増強するための方法を提供する。培地中で顆粒球を保存するための化合物の能力を確立するために、化合物を、多数のインビトロアッセイにおいて試験した。顆粒球の生存への影響を試験するための1つの一般的なモデルは、新鮮な全血から顆粒球を分離する工程、細胞を37°Cで培養する工程、および細胞を、核高2倍体性について24時間間隔で試験する工程 (実施例110に記載の通り) を包含する。高2倍体DNAの存在は、アポトーシスの指標であり、これはプロピジウムヨージド染色を用いて、フローサイトメトリーにより評価される。本発明の化合物を、培地中の顆粒球と共にインキュベートし、それらが顆粒球の生存に及ぼす影響を測定し、そしてIC₅₀を計算した。図6において、Tetrahedron Letter, 35 9693-9696(1994)に記載の通りに調製されたカスパーズインヒビター (caspase inhibitor) zVADfmkは、48時間における顆粒球の生存の改良への影響が弱いのにに対し、本発明の実施例43、70、および106は、5 μ M未満のIC₅₀を有するので、これらは顆粒球の死に対する強力なインヒビターである。

40

レスピレイトリバーサストに耐える能力は、顆粒球の生存率の別の尺度である。レスピレ

50

イトリーバーストは、細菌などの外部刺激に対する顆粒球の生理学的応答である。この実施例において、レスピレイトリーバーストを誘発するための方法は、オプソニン化細菌性ザイモサンを利用した。レスピレイトリーバーストは、化学ルミネッセンスにより測定された。図7は、カスパーズインヒビターzVADfmk（これは、高2倍体性実験における顆粒球の生存率に対する影響が弱い）は、レスピレイトリーバーストを維持しなかったことを示している。対照的に、本発明の2つの例示的な化合物である実施例43および70は、レスピレイトリーバーストを実質的に48時間維持し、そして顆粒球の培養後、レスピレイトリーバーストを72時間、部分的に維持した。

全血中の顆粒球の生存は、単離された顆粒球と同様の様式で、フローサイトメトリーによる高2倍体性分析により測定された。本発明のICE/ced-3インヒビターは、以下の表に示すように、室温にて、顆粒球の生存を全血中で96時間維持した：

全血中における2倍体顆粒球の割合

	時間 0	96 時間
化合物なし	96%	48%
実施例 43	96%	91%
実施例 70	96%	89%

従って、本発明は、単離された成熟顆粒球および全血中の成熟顆粒球の両方において、エクスピボでの生存を維持するための方法を提供する。本実施例の方法はまた、顆粒球の生存の維持において効果的なこれらのICE/ced-3インヒビターを、効果的でないものから識別するための手段を提供する。

実施例112

ICE/ced-3インヒビターの適用による、除去療法産物の生存の増強

顆粒球に富む細胞の個体群を得るために、血液ドナーの除去療法（白血球搬出法）を実行し得る。次いで、これらの細胞を、さらなる顆粒球を必要とするレシピエントに輸血する。この除去療法の産物の保存期間は短く、そして、現在の標準（American Association of Blood Banks, Standard for Blood Banks and Transfusion Services, Ed. 17, 1996）では、20～24℃にて24時間を超えない間の保存が必要とされる。輸血は、可能であれば6時間以内に行うことが推奨されている。

本発明において記載される例示的な化合物は、除去療法の産物の貯蔵期間を延長するのに用いられ得る。実施例111に示すように、ICE/ced-3インヒビターは、単離された顆粒球および全血について、顆粒球の生存を延長するのに効果的である。除去療法のセッティングにおける使用について、この化合物は、ジメチルスルホキシド（DMSO）などの混和性溶媒中で処方され得る。この化合物は、バイアル中で貯蔵され得、そして除去療法バッグに予め添加され得るか、または回収プロセスの間にドナーの除去療法ラインに注入され得る。効果的な化合物の最終濃度は、1～25μMの範囲内であり得る。次いで、ICE/ced-3インヒビターを含む白血球搬出法産物を、貯蔵の後にレシピエントに注入する。種々の貯蔵条件が可能であり、例えば、貯蔵は、室温にて、回収後1週間までであり得る。

実施例113

骨髓再構築／造血細胞の回収

造血細胞の再構築の促進における有用性を示すために、化合物を、いくつかの動物モデルにおいて試験した。造血細胞を破壊するための1つの一般的なモデルには、マウスの致死照射または準致死照射を包含し、このモデルでは、動物をX線（通常、¹³⁷セシウム源から発生する）に曝露する。準致死照射の場合、回復をモニタリングするために、照射後の異なる時間において、造血を測定するための種々の指標点を決定し得る。本発明の化合物を、準致死照射の後に動物に投与し、そしてそれらが回復に及ぼす影響を測定する。指標点には、以下が含まれ得る：ヘマトクリット値、白血球細胞数、トリチウム化チミジンの骨髓DNAへの取り込み、脾臓重量、脾臓あるいは上腕骨または大腿骨からの骨髓からの、

10

20

30

40

50

バースト形成ユニット-赤血球 (burst-forming unit-erythroid) の数またはコロニー形成ユニット (赤血球、顆粒球/マクロファージおよび巨核球形成結合) の数。いくつかの場合には、カルボプラチン (carboplatinum) などの化学療法剤の注入により、動物をさらに骨髄抑制し得る。異なる機構により作用するとはいえ、これらのモデルにおいて効果的な化合物には、とりわけ、トロンボポエチン、Photofrin、ヘム、インターロイキン-1、およびテトラクロロデカオキシドが挙げられる。

致死照射のモデルもまた、一般に動物を救助するための骨髄移植片を包含しているとはいえ、効果を試験するのに使用され得る。これらの実験は、しばしばマウスで行われるが、これに限定されない。次いで、上記と同様の指標点を用いて、同種移植片についての移植のための時間が測定され得る。造血細胞のヒト起点を最初に確立した後、ヒト前駆細胞の移植もまた、上記と同様の方法により、レシピエントとしてSCID-huマウスを用いて測定され得る。これらの場合、本発明の化合物は、骨髄移植の時点で、レシピエント動物に投与される。骨髄細胞はまた、移植の前に、ICE/CED-3ファミリーのインヒビター化合物で処理され得る。

実施例114

移植

心臓、肝臓、および腎臓を包含する多くの器官系について、多数の種類の移植の研究が行われてきた。これらの研究の目的には、移植の前に組織の貯蔵を最適化する方法、および移植拒絶を最小化するための方法が包含される。本出願は、組織の貯蔵を最適化することに焦点を当てているが、移植片の機能を延長することおよび移植拒絶を最小化することへの適用もまた可能である。

心臓を麻痺させるために設計された、心臓麻痺溶液 (cardioplegic solution) を、心肺バイパスのためおよび移植のために用いる。これらの溶液の最も一般的なものは、University of Wisconsin溶液およびSt. Thomas' Hospital溶液である。移植の前に心臓を貯蔵し得る期間は、数時間に限られる。心臓の生存度を延長するために、これらの溶液への試験添加物に対して種々の実験的アプローチがなされている。心臓をドナー動物から取り出し、そして単離した調製物 (一般に、Langendorff調製物として公知である) 中で機能を研究した (Galinanesら、J. Thoracic & Cardiovascular Surgery, 104; 151, 1992)。心機能の低下は、貯蔵時間の関数として測定され得、そして測定されるパラメータには、心拍出量、左心室圧、収縮力、心拍数、および冠状動脈フロー (coronary flow) が挙げられ得る。

保存溶液の効果は、肝臓および腎臓移植についてもまた研究されてきた。この例では、器官は、通常、溶液中に所定の時間貯蔵され、次いでレシピエントに移植される。これらの研究の一般的な指標点は、生存の長さおよび移植片の組織学的検査である。肝臓移植については、移植片の機能は、血液中のアラニンおよびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの濃度を測定することによっても評価され得る。腎臓移植については、移植片の機能は、尿中の血液濃度、血中尿素窒素 (BUN)、およびクレアチニンキナーゼを測定することによって評価され得る。

上記のように、移植のための器官の適切な貯蔵は、器官の生存率を維持するために重要である。利用可能な器官が不足していることを仮定すれば、器官 (特に、死体からの器官) が維持され得る時間の長さを延長することは、移植医学にとって非常に重要である。心臓は、単離および貯蔵の間に特に損傷を受けやすいようである。これらの条件を改良することは、移植に利用可能な生存心臓の数の増加をもたらし得る。改良された器官貯蔵溶液はまた、器官を、取り出す前に灌流する (これにより、おそらく器官の保護効果がさらに増強される) のに用いられ得る。本発明の方法は、ICE/CED-3インヒビターを貯蔵溶液に添加することからなる、このような改善された方法を提供する。

本発明を、上記で提供した実施例を参照して記載したが、本発明の精神から逸脱することなく種々の改変がなされ得ることが理解されるべきである。従って、本発明は、請求の範囲によってのみ限定される。

【図 1】

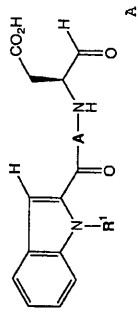


表 1
式Aに関する50%阻害濃度 IC_{50}

実施例	R^1	A	MICE IC_{50} (μM)	CPP32 IC_{50} (μM)
4	CH_3	Ala	0.177	>10
10	CH_3	Pro	11.7	>50
13	CH_3	Val	0.531	2.48
15	CH_3	Leu	5.52	5.62
21	CH_3	Phe	3.34	49.8
24	CH_3	Gly	34.7	>50
27	$(CH_2)_2CH=CH_2$	Ala	0.393	>50
30	$(CH_2)_2CH=CH_2$	Val	0.313	1.45
33	$(CH_2)_2CO_2H$	Ala	1.63	>50
参照	--	--	0.198	>50
			0.064	47.0

【図 2】

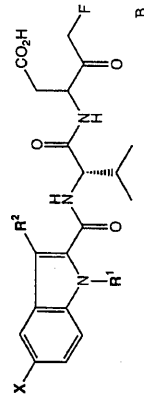


表 2
式Bに関する解離定数 K_1 および不活性化速度 k_2/k_1

実施例	R^1	R^2	X	MICE K_1 (μM)	MICE k_2/k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	CPP32 K_1 (μM)	CPP32 k_2/k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	Mch2 K_1 (μM)	Mch2 k_2/k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	Mch5 K_1 (μM)	Mch5 k_2/k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)
43	CH_3	CH_3	H	1.40	2,860	0.960	13,400	0.017	58,800	0.062	21,500
46	CH_3	CH_3	H	1.50	7,150	0.830	25,900	ND	ND	0.099	37,000
49	CH_3	CH_3	F	1.50	7,150	0.830	25,900	ND	ND	0.054	52,500
52	$(CH_2)_2Ph$	CH_3	H	0.133	45,100	0.732	32,700	0.014	71,400	0.077	32,500
55	Ph	CH_3	H	0.843	8,900	0.110	74,200	0.038	51,600	0.038	127,000
58	CH_2CO_2H	CH_3	H	0.327	16,800	0.125	58,700	0.053	33,600	0.038	127,000
61	CH_3	CH_3	H	0.240	41,700	0.520	21,200	0.033	30,300	0.026	38,500
62	CH_3	CH_3	F	0.397	7,560	0.113	44,200	0.040	25,000	0.102	29,400
63	$(CH_2)_2CH=CH_2$	CH_3	H	0.327	18,300	0.125	56,000	0.104	19,200	0.038	131,600
64	CH_3	CH_3	H	0.234	21,400	0.180	38,900	0.052	38,500	0.063	47,600
65	CH_3	$CH_2CH(CH_3)_2$	H	4.56	1,540	2.28	7,910	0.023	43,500	0.063	31,700
66	CH_3	$(CH_2)_2Ph$	H	0.632	14,200	0.505	21,800	0.038	26,300	0.051	39,200
67	CH_3	CH_3	OC_2H_5	0.739	14,900	0.346	31,800	0.040	25,000	0.062	16,100
参照	--	--	--	0.015	278,000	0.820	14,600	0.594	3,370	0.018	83,300

【図 3】

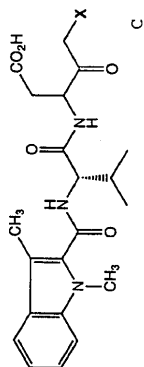


表 3
式Cに関する解離定数 K_1 および不活性化速度 k_2/k_1

実施例	X	MICE K_1 (μM)	MICE k_2/k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	CPP32 K_1 (μM)	CPP32 k_2/k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	Mch2 K_1 (μM)	Mch2 k_2/k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)	Mch5 K_1 (μM)	Mch5 k_2/k_1 ($M^{-1}s^{-1}$)
43	F	1.40	2,860	0.960	13,400	0.017	58,800	0.062	21,500
70	$OCO(2,6-\text{bis-C}_1-\text{C}_6\text{H}_5)$	1.16	3,480	0.052	57,700	0.030	33,300	0.364	2,750
71	$OPO(C_6H_5)_2$	0.124	24,200	0.046	65,700	0.060	50,000	0.022	45,500
72	$O(1-Ph-3-CF_3-2-ナフチル)$	0.873	1,150	0.300	16,700	0.050	20,000	1.39	720
73	$O(3-CONH_2-2-ナフチル)$	8.00	250	1.58	0	0.932	1,580	0.213	0
74	$O(2-CONH_2-1-ナフチル)$	0.297	3,370	0.419	4,770	0.340	2,340	0.547	0
75	$OPO(C_6H_5)_2$	4.33	1,850	1.05	7,660	ND	ND	0.663	1,510
参照	--	0.015	278,000	0.820	14,600	0.594	3,370	0.018	83,300

【図 4】

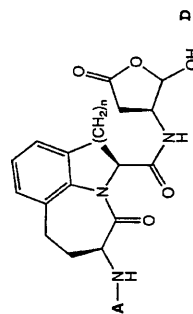
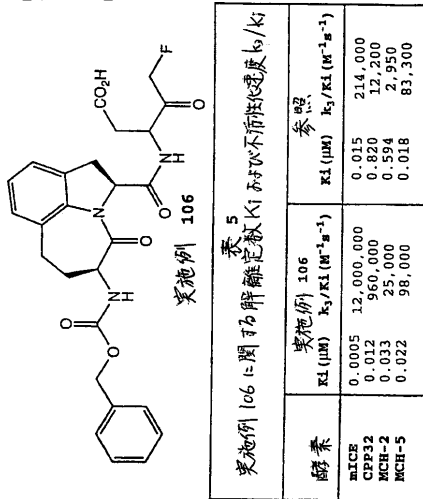


表 4
式Dに関する50%阻害濃度 IC_{50}

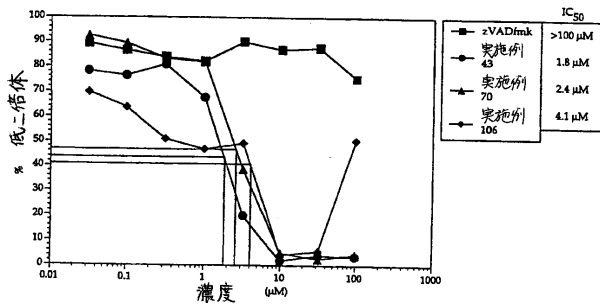
実施例番号	A	MICE IC_{50} (μM)	MICE IC_{50} (μM)	CPP32 IC_{50} (μM)	CPP32 IC_{50} (μM)	Mch2 IC_{50} (μM)	Mch2 IC_{50} (μM)	Mch5 IC_{50} (μM)
78	Cbz	1	1.03	40.1	6.96	>10	>10	>10
82	Ac-Asp	1	0.694	6.47	0.0014	1.45	1.45	1.45
85	2-ナフチル	1	0.571	0.245	2.83	7.98	7.98	7.98
88	Cbz-Asp	1	0.096	ND	0.00052	1.81	1.81	1.81
91	2-ナフチル	1	0.045	0.780	ND	>10	>10	>10
94	Ac	1	3.07	3.87	>10	>10	>10	>10
100	1-ナフチル	1	0.159	8.77	>10	>10	>10	>10
97	1-ナフチル	1	0.010	2.91	12.3	1.09	1.09	1.09
103	Cbz	2	0.026	0.437	32.0	1.11	1.11	1.11
参照	--	--	0.064	47.0	>10	>10	>10	>10

【図 5】



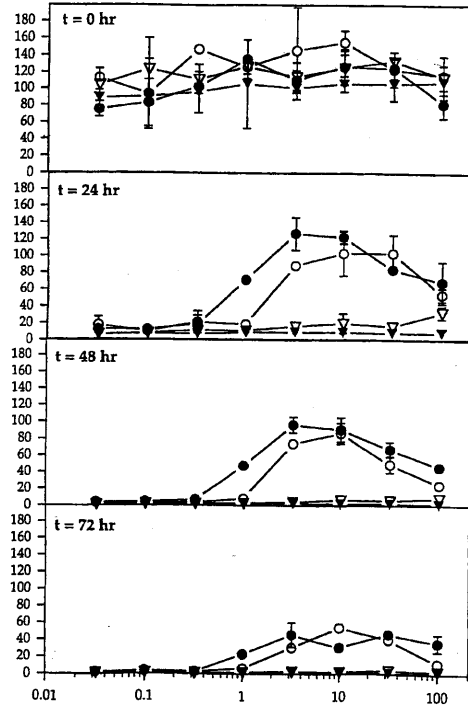
【図 6】

アロビジウムヨード標識化好中球の FACS 分析:
4 時間時点



【図 7】

好中球生存 および バースト アッセイ



○ 実施例 43, ● 実施例 70, ▽ zVADfmk, ▼ 処置なし
化合物の濃度 (μM)

オアロニ化サレチンを用いたバースト活性
(表 1 参照 T=0 コントロールのバースト)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 Q 1/68 (2006.01) C 1 2 Q 1/68 A

(31)優先権主張番号 08/767,175

(32)優先日 平成8年12月16日(1996.12.16)

(33)優先権主張国 米国(US)

(72)発明者 トマセリ, ケビン ジェイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 0 3, サン ディエゴ, ジャックドウ ストリート 3
6 6 5

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 国際公開第9 6 / 0 2 5 5 0 1 (WO, A 1)

NICHOLSON,DW et al., Nature, vol.376, pp.37-43 (1995)

GAGLIARDINI,V et al., Science, vol.263, pp.826-828 (1994)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/06

A61K 38/55

A61K 45/00

A61K 48/00

A61P 43/00

C12Q 1/68

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

PubMed