

平成17年9月修了  
博士（工学）学位論文

血小板凝集抑制剤の合成と構造活性相関に  
関する研究

Synthesis and structure-activity relationships of platelet  
aggregation inhibitors

高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻（社会人特別コース）

学籍番号 1086301

山中 敏夫

Toshio Yamanaka

## 目次

論文要旨	1
序論	3
本論	9
第1章 フィブリノゲン RGD ペプチドを模した血小板凝集抑制剤プロトタイプ化合物の創出	9
1. 1. 血小板凝集抑制作用を有する分子骨格の設計	9
1. 2. RGD $\beta$ -ターンを模したプロトタイプ候補化合物の合成	13
1. 2. 1. プロトタイプ候補化合物の合成スキーム	13
1. 2. 2. 中員環 $\beta$ -アミノ酸ラセミ誘導体の合成	14
1. 2. 3. 中員環 $\beta$ -アミノ酸の不斉合成	17
1. 2. 4. プロトタイプ候補化合物の合成	19
1. 3. プロトタイプ候補化合物の生物活性評価	21
1. 3. 1. 血小板凝集抑制率 ( $IC_{50}$ )の測定法	21
1. 3. 2. プロトタイプ候補化合物の血小板凝集抑制率	22
1. 4. 光学活性プロトタイプ候補化合物の合成	23

1. 5. 光学活性プロトタイプ候補化合物の血小板凝集抑制作用とプロトタイプ化合物の決定	24
1. 6. 考察	25
1. 7. 小括	26
1. 8. 実験の部	27
1.8.1. General	27
1.8.2. Chemistry	27
1.8.3. Platelet Aggregation Study	47
第2章 安全性の高い血小板凝集抑制注射剤の創出	48
2. 1. 安全性の高い血小板凝集抑制注射剤の創出の意義	48
2. 2. 主作用と副作用を示す評価法の定義とプロトタイプ化合物の評価	49
2. 3. 血小板凝集抑制作用の向上のための分子設計	50
2. 4. プロトタイプ化合物からの変換	51
2. 5. プロトタイプ変換化合物の薬理活性評価	53

2. 6. イヌでの血小板凝集抑制作用と出血時間延長作用との乖離度測定	55
2. 6. 1. 測定方法	55
2. 6. 2. 結果	57
2. 7. 考察	58
2. 8. 小括	59
2. 9. 実験の部	60
2.9.1. Chemistry	60
2.9.2. Platelet adhesion to vWF coated plate	69
2.9.3. Calculation of the plasma concentrations for 50% inhibition of platelet aggregation and for 2.5-fold prolongation of the bleeding time in dogs	70
第3章 血小板凝集抑制経口剤の創出	71
3. 1. 経口剤創出の意義と課題	71
3. 2. 経口吸収性を考慮した血小板凝集抑制剤の分子設計	72
3. 3. 血小板凝集抑制経口剤の合成	74
3. 3. 1. 合成方法	74
3. 3. 2. $\beta$ 置換 $\beta$ -アミノ酸エステルの合成	74
3. 3. 3. 経口剤候補化合物への誘導	77

3. 4. 経口剤候補化合物の血小板凝集活性と経口吸収性の測定	79
3. 5. $\beta$ -エチニル置換誘導体の生物学的利用率 (BA)	82
3. 6. プロトタイプ化合物への不飽和結合を導入した誘導体の合成	83
3. 6. 1. 光学活性 $\beta$ -エチニル- $\beta$ -アミノ酸誘導体の新規合成法の確立	83
3. 6. 2. $\beta$ -エチニル置換誘導体の合成	85
3. 7. 不飽和誘導体の血小板凝集抑制作用と経口吸収性	86
3. 8. 不飽和誘導体の経口吸収性の改善	87
3. 8. 1. プロドラッグ化の検討	87
3. 8. 2. プロドラッグ体の合成	87
3. 8. 3. プロドラッグ体の経口吸収性	88
3. 8. 4. 最適プロドラッグ化合物の経口吸収率	89
3. 9. 小括	91
3. 10. 実験の部	92
3.10.1. Chemistry	92
3.10.2. Pharmacokinetic Studies	120
第4章 総括	122

参考文献	126
研究業績	131
謝辞	133

## 略語表

本論文において以下に示す略語及び略号を用いた。

Ac	acetyl
ADP	adenosine diphosphate
aq	aqueous
Arg	arginine
Asp	aspartic acid
AUC	area under the concentration-time curve
BA	bioavailability
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
<sup>n</sup> Bu	normal butyl
cAMP	cyclic AMP (Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate)
Cbz	benzyloxycarbonyl
COX	cyclooxygenase
D	aspartic acid
de	diastereomeric excess
DMAP	4-dimethylaminopyridine
DMF	N, N-dimethylformamide
ee	enantiomeric excess
EDC	1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide
eq	equivalent
Et	ethyl
G	glycine
Gly	glycine
GPIb	Glycoprotein Ib
GPIIb	Glycoprotein IIb
GPIIIa	Glycoprotein IIIa
GPIIb/IIIa	Glycoprotein IIb/IIIa
h	hour(s)
HOBT	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectra
IC <sub>50</sub>	half inhibition concentration

IPE	diisopropylether
i.v.	intravenous
Me	methyl
mp	melting point
MS	mass spectra
NMR	nuclear magnetic resonance
<sup>n</sup> Pen	normal pentyl
p.o.	per os
<sup>i</sup> Pro	iso propyl
R	arginine
rt	room temperature
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TMS	trimethylsilyl
TXA <sub>2</sub>	thoronboxane A <sub>2</sub>
vWF	von WillBrand Factor



## 研究要旨

血管中の血栓が引き金となって発症する心筋梗塞、不安定狭心症、脳梗塞などの心疾患、脳疾患を防止する新しい形の血小板凝集抑制剤を創出した。本研究では、血小板凝集を阻害するが血管修復機能は阻害しない、すなわち出血傾向の少ないより安全な注射剤、および慢性患者、通院患者、予防投与にも使用しやすい経口剤の創出に重点を置いた。

血栓の中でも特に問題となる動脈血栓形成は、まず血小板膜上にある糖蛋白 GPIIb/IIIa が種々の要因により活性化されることにより開始される。この活性化された GPIIb/IIIa は、血漿中の蛋白であるフィブリノゲンと架橋を形成する。その結果、血小板が凝集し、動脈血栓が形成される。GPIIb/IIIa の活性化を誘導する物質の生成を阻害する薬剤が抗血栓剤として利用されているが、その薬効は十分ではない。そこで、著者は GPIIb/IIIa とフィブリノゲンとの結合阻害を起こす新しいタイプの血小板凝集抑制剤の創出研究を行った。

GPIIb/IIIa は、フィブリノゲン  $\alpha$  鎖のアルギニン(R)–グリシン(G)–アスパラギン酸(D)残基を特異的に認識し、凝集を起こす。このフィブリノゲン RGD 残基は、Figure 1 に示すようにグリシン部分でペプチド鎖が折れ曲がった  $\beta$ -ターン構造を取っている。この RGD  $\beta$ -ターンを非ペプチド性小分子の構造に擬似変換すれば、血小板凝集抑制作用を示す化合物が創出できると考えた。そこで、血小板凝集に必須な官能基である R 残基のアミノ基部分と D 残基のカルボン酸間の分子鎖とほぼ同じに長さを持つ非ペプチド性分子を設計した。次に、この分子にどの

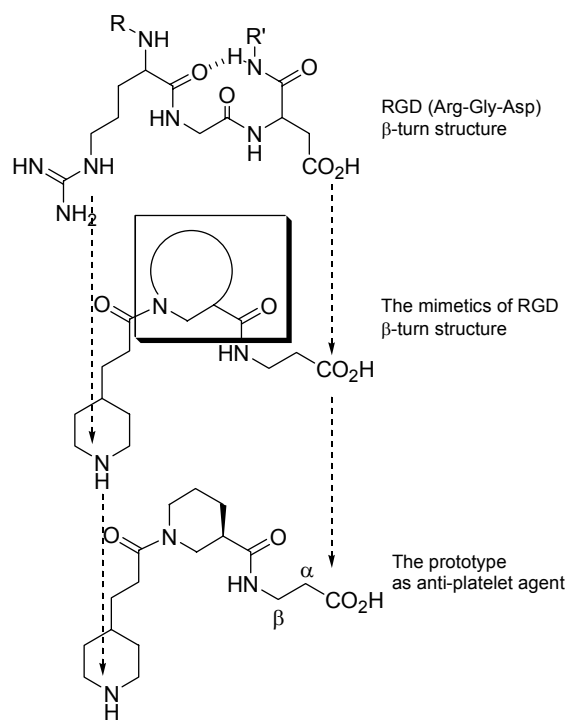
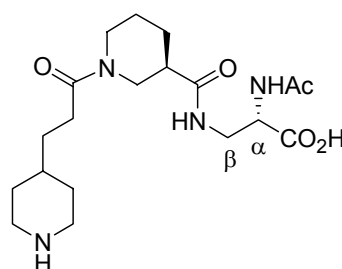


Figure 1. The drug design of RGD  $\beta$ -turn mimetics (RGD- $\beta$  ターンを模した分子設計)

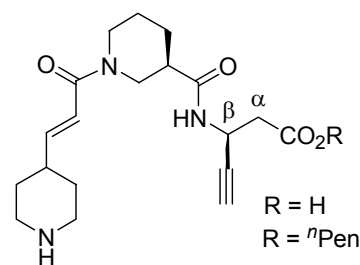
ような環状構造を組み込めば $\beta$ -ターンが最も忠実に再現できるかを検討した。その結果、6員環構造を組み込んだ化合物 (Figure 1) が良好な血小板凝集抑制作用を示すことを見出した。この化合物をプロトタイプとし、以下の2種の薬剤創出研究に展開した。

まず、この非ペプチド性分子をプロトタイプとして、出血傾向の少ない、安全性の高い注射剤の創出を行った。GPIIb/IIIa拮抗作用の向上を目的として、Figure 1に示した6員環化合物のカルボキシル基の $\alpha$ 位に種々の置換基を導入した。その結果、Figure 2に示す様に $\alpha$ 位にアセトアミド基を導入した化合物が高い血小板凝集抑制作用を示した。イヌにおける出血延長作用実験では、この化合物は血小板凝集を抑制し、かつ副作用である出血時間の延長との乖離度が大きい、非常に安全性の高い血小板凝集抑制剤であることが判明した。



**Figure 2.** The structure of injectable anti-platelet agent (血小板凝集抑制注射剤の構造)

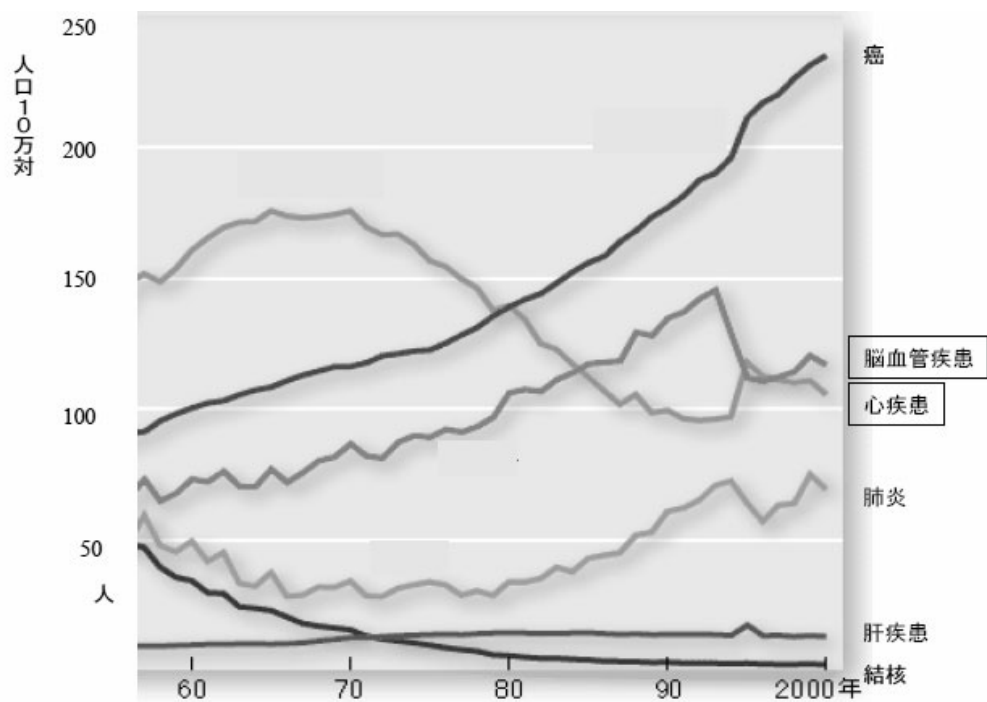
次に、種々の脂溶性置換基をFigure 1に示した6員環化合物のカルボキシル基の $\beta$ 位に脂溶性置換基を導入した化合物の合成を行った。その結果、Figure 3に示す化合物 ( $R = H$ ) が高い血小板凝集抑制作用を有し、かつ経口吸収性に優れている薬剤であることが判明した。経口吸収性の向上をさらに検討した結果、活性部位の一つであるカルボン酸をペンチルエステル体に変換した化合物 (Figure 3,  $R = {}^n\text{Pen}$ ) が、より経口吸収性に優れた薬剤であることを見出した。この化合物は、カルボン酸部分がペンチル基でエステル化されているために、分子の脂溶性が向上する。その結果、薬剤の消化管からの吸収が改善した。この薬剤自体は薬理活性を発現しないが、消化管からの吸収の際にペンチルエステル基が消化管壁内酵素により加水分解され、血中には薬理活性を発現するカルボン酸体にて存在することが分かった。



**Figure 3.** The structures of orally-active anti-platelet agents (血小板凝集抑制経口剤の構造)

## 序 論

現代日本人の死因別死亡率の推移を、厚生労働省人口動態統計より見ると、癌による死亡が戦後急激に増加しトップであり、更に増加傾向にあることが伺える (Figure 4)<sup>1)</sup>。それに引き続き、3大成人病と呼ばれる範疇にある脳血管疾患、心疾患が続いている。これら2領域疾患は、様々な治療法の確立、及び国民の生活習慣の改善により、徐々に減少傾向に

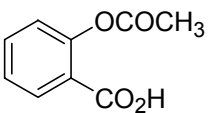
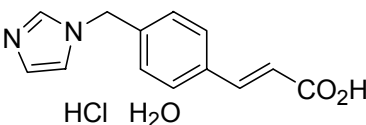
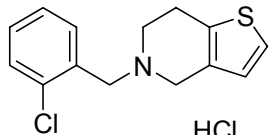


**Figure 4.** The transition of Japanese death rate categorized by the type of diseases  
(日本人の疾患別死亡率の推移)

あるものの、依然として2位、3位と高い死亡率を示している。脳血管疾患、心疾患の代表例として、高血圧症、高脂血症、脳梗塞、慢性動脈閉塞症、心筋梗塞、不安定狭心症が挙げられる。これらの中で脳梗塞、慢性動脈閉塞症、心筋梗塞、不安定狭心症は、血管、主に動脈中の血栓が引き金となり、血液の流れが悪くなり、その結果、血管に過剰の負担がかかることによって起こる疾病である。また、高脂血症も血液中のコレステロールが血管壁に付着することにより血流が悪くなり、それが引き金となって血栓が形成され、様々な

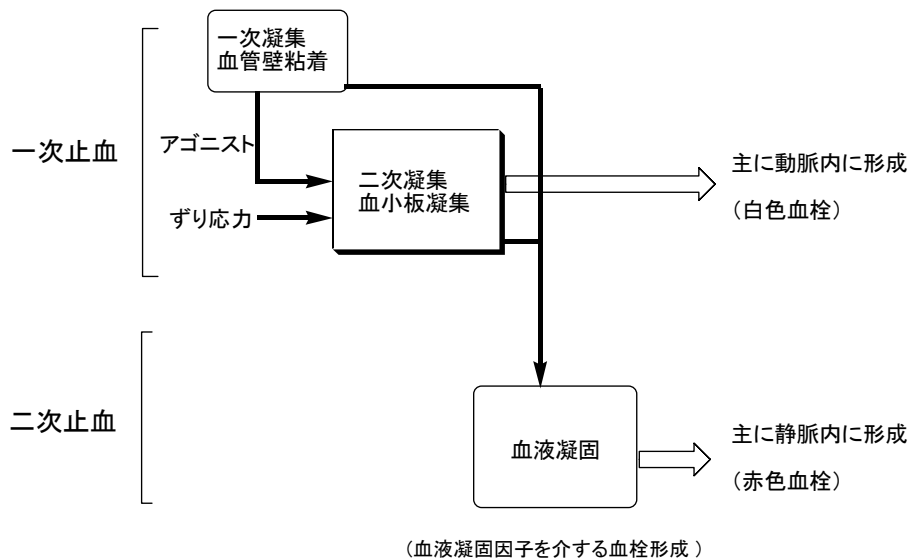
疾病へと誘導される<sup>2)</sup>。血栓、特に動脈中で形成される動脈血栓は、主に血液中の血小板が血管内で凝集、凝固することにより形成される。赤血球、白血球などとともに、代表的な血液成分の一つである血小板<sup>3)</sup>は、直径2-4 μmと大きさで全ての血球群の中で最も小さく、骨髄中の巨核球から生成され、その個数は成人で約20-40万/μl存在する。血小板の寿命は約2週間前後とされている。血小板はお互いに接着(凝集)するという特異な性質を有する。血管が破綻し、出血が起こると、血小板が血管損傷部位に速やかに粘着、凝集し、出血を阻止する。これが血小板本来の働きである。しかし、例えば動脈硬化性疾患では、血管内皮細胞損傷部位に血小板が粘着、凝集を起こし、これが病的血栓の発症原因となる。この病的血栓生成の防止に血小板凝集抑制剤が必要とされている。現在、アスピリン<sup>4)</sup>、オザグレレル<sup>5)</sup>、チクロピジン<sup>6)</sup>等の血小板凝集抑制剤が上市されている (Table 1)。しかしながら、これらの薬剤の薬効は必ずしも十分ではなく、また副作用として、血小板の血管壁修復機

**Table 1. Representative anti-platelet agents for clinical use in Japan**  
(国内の臨床で使用されている代表的な血小板凝集抑制剤)

薬剤名	構造式	作用メカニズム
アスピリン		シクロオキシゲナーゼ阻害による TXA <sub>2</sub> 産生抑制
オザグレレル		トロンボキサンA <sub>2</sub> 合成酵素阻害
チクロピジン		アデニレートシクレート活性化による 血小板内cAMPを増加 (遊離Ca <sup>2+</sup> を取り込むことで、各種顆粒の放出を防ぐ)

能を低下させ、出血を起こしやすくさせる。特に、チクロピジンについては血栓性血小板減少性紫斑病<sup>7)</sup>を起こさせ、血小板減少、溶血性貧血、精神神経症状、発熱、腎機能障害の5主徴に加え、最悪の場合は死をもたらすといった副作用症例が報告されている。このため厚生労働省よりこの薬剤に対する緊急安全性情報が発令され、非常に慎重に使用せねばならない薬剤となっている。

生体内での止血機構は次の2段階に分類される (Figure 5)<sup>8)</sup>。すなわち、一次止血と呼ばれる血小板凝集と二次止血と呼ばれる血液凝固に分類される。一次止血は、更に一次凝集と二次凝集に分けられる。一次凝集とは以下のことを言う。血管内皮細胞が障害を受け剥離すると、血管内皮細胞下組織のコラーゲンが露出する。これが血管内皮細胞内、または血漿中に存在する蛋白 フォンビルブランド因子<sup>9)</sup> (von Willebrand Factor; vWF)と結合する。血小板はその表面膜上に存在する糖蛋白グリコプロテイン Ib (Glycoprotein Ib; GPIb) またはグリコプロテイン IIb/IIIa<sup>10)</sup> (Glycoprotein IIb/IIIa; GPIIb/IIIa) を介してこのコラーゲンに結合した vWF と結合し、血管内皮細胞に粘着する。血小板は vWF を介さずに直接 GPIb とコラ



**Figure 5. Classification of hemostatic mechanism (止血機構の分類)**

ーゲン部分が結合する場合もある。これらが一次凝集と呼ばれる血管壁への血小板の粘着現象である<sup>11)</sup>。

その後、一次凝集により血管壁へ粘着した血小板内に活性化信号が伝わり、粘着血小板は活性化され、この血小板内の顆粒から含有物質が放出される。含有物質の例として、アデノシン 2 リン酸 (ADP)、トロンビン、セロトニン、フィブリノゲン、vWF、または後述する二次止血で重要となる凝固第 V 因子や血小板第 4 因子も放出される。同時に、血小板内のアデニル酸シクラーゼが産生されアラキドン酸カスケードが働き、トロンボキサン A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)が生合成される。これらの物質が血小板同士での凝集を起こす刺激物質 (アゴニス

ト)となる。これらアゴニストにより血小板膜上の GPIIb/IIIa が活性化され、血小板同士で凝集を起こす<sup>12)</sup>。これが二次凝集である。これとは対照的に、アゴニストの非存在下でも血管内の過剰な「ずり応力」により血小板が活性化され、ずり応力惹起血小板凝集と呼ばれる血小板二次凝集を引き起こす場合がある<sup>13)</sup>。ここで言う「ずり応力」とは、以下のことを意味する。血液は血管内を一定の速さで流れている。血管内の血流速度は、一般的に中心軸で最も速く、血管壁に近づくに従い遅くなる。この血液速度の違いにより血小板は、ある程度の負荷を受けている。これがずり応力である。通常の動脈内で発生するずり応力程度では血小板には影響は及ぼさないが、動脈硬化等により血管狭窄を起こした部分や細動脈では通常の 10~100 倍程度のずり応力が発生する。この過剰なずり応力により血小板が刺激を受け血小板凝集を起こすことがある。高脂血症や高血圧症などで血栓形成を引き起こす危険性があるのはずり応力の影響によるものが大きい。このように、血小板は様々な要因により活性化され、凝集を起こす。これらの血小板二次凝集のさらに詳しい作用メカニズムについては後述する。

二次凝集を受けた血小板は、血液凝固反応を形成するのに必要な場となる。ここに様々な凝固因子と呼ばれる蛋白が関与し、最終的にトロンビンと呼ばれるセリンプロテアーゼが生成される。このトロンビンがフィブリノゲンを不溶性フィブリン（繊維素）に転換させ血液凝固が起こる。これが二次止血反応である。このトロンビンは、さらに血小板を活性化させるアゴニストとしても作用する。近年、トロンビンの受容体が血小板膜上や血管内皮細胞に存在していることが見出され、血栓生成に深く関与していることが分かった<sup>14, 15)</sup>。

一次止血反応での血小板凝集により形成される血栓は、血小板とフィブリンから形成され、赤血球に乏しいことから一般に白色血栓と呼ばれる。このタイプの血栓は血流の速い動脈中でよく見られる。これに対し、二次止血反応で各種凝固因子によって形成される血栓は、赤血球とフィブリンから主に形成されることから赤色血栓と呼ばれる。この赤色血栓は、静脈で形成されることが多い。なぜならば、動脈中で凝集を起こした白色血栓が静脈に運ばれ、血流が遅くなったときにそれが引き金となり赤色血栓が形成されるためである。現在問題となっている脳梗塞や心筋梗塞を引き起こす原因は、動脈中で形成される白

色血栓が大きな割合を占めている。二次止血反応に基づく血栓は、一次止血反応による血小板凝集により誘発されることから、一次止血反応に基づく血小板凝集反応を阻止することが非常に重要である。

次に、一次止血、二次凝集である血小板凝集のメカニズムを更に詳しく述べる (Figure 6)。血小板の表面には血小板凝集を起こす膜糖蛋白 GPIIb/IIIa が存在する。この GPIIb/IIIa は平常状態では血小板凝集を起こさない。しかし、先ほど述べた様にトロンビン、コラーゲン、TXA<sub>2</sub>、ADP、セロトニンなどの各種アゴニストにより一旦血小板が外的刺激を受けると、血小板表面の GPIIb/IIIa が活性化し、この糖蛋白の立体構造が変化する。こうして活性化された GPIIb/IIIa は、血漿中の蛋白であるフィブリノゲンと次々に架橋を形成して血小板同士の凝集が起こり、その結果として白色血栓を形成する。

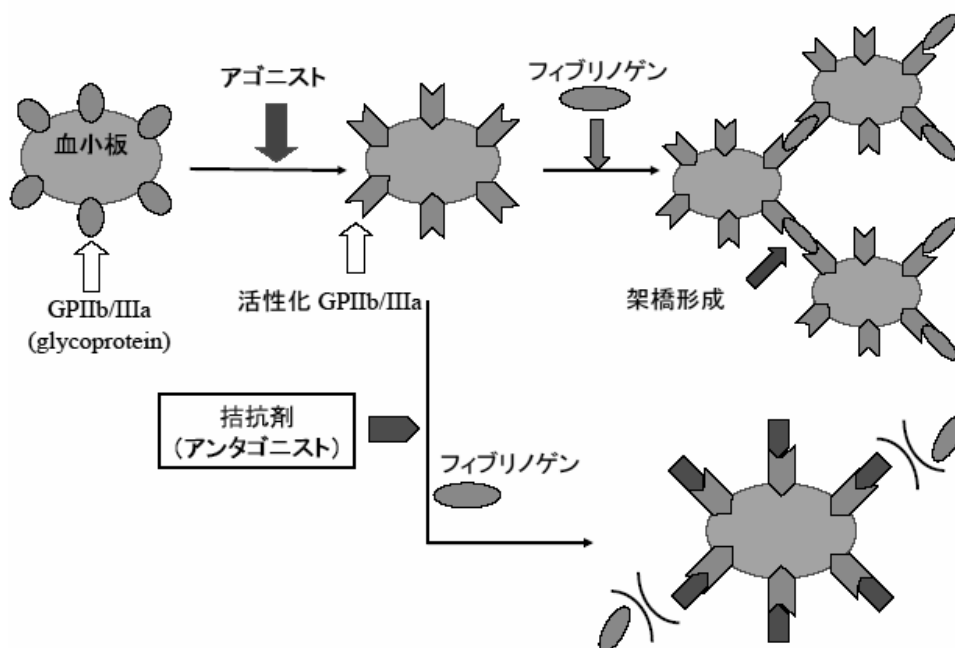


Figure 6. The mechanism of the platelet aggregation (血小板凝集のメカニズム)

Table 1 に示した現在使用されている血小板凝集抑制剤の作用メカニズムは、何れも血小板を刺激するアゴニストの生成を抑え、血栓形成を阻止する。例えば、アスピリンは血管内皮細胞と血小板から産生される酵素シクロオキシゲナーゼ (COX) の作用を阻害し、TXA<sub>2</sub> の生成を抑制する。しかしながら、これら既存の血小板凝集抑制剤の薬効は必ずしも万全ではない。なぜなら、これらの薬剤は何れもトロンビン、コラーゲン、TXA<sub>2</sub>、ADP 等のア

ゴニストの一種のみの生成を抑えるに過ぎない。たとえ一種のアゴニスト生成を抑えたとしても、他のアゴニストにより血小板が活性化され、結果として血小板凝集が惹起されるからである。このようなことから、著者は、これまでと違った全く新しい作用メカニズムを有するより効果的な血栓凝集抑制剤の創出を目指した。すなわち、活性化された GPIIb/IIIa がフィブリノゲンと架橋を形成するよりもより強固に GPIIb/IIIa と結合する薬剤が創出できるならば、フィブリノゲンとの架橋形成ができなくなるため、優れた血小板凝集抑制剤となりうると考えた。なぜならば、いかなるアゴニストで GPIIb/IIIa が活性化されたとしても、活性化された GPIIb/IIIa がフィブリノゲンと架橋し血栓が形成されるパスはただ一つであるため、このパスさえ阻害すれば、血栓の形成は、完全に阻止できると考えられるからである。

本論文の第一章では、先ず活性化された GPIIb/IIIa と結合するフィブリノゲン中の結合部位であるアルギニン-グリシン-グルタミン酸 (Arg-Gly-Asp; RGD)トリペプチド構造を基礎にした、血小板凝集抑制剤の創出について述べる。続いて、この RGD 分子を模した基本骨格となる非ペプチド性小分子の設計、合成、および薬理活性評価について述べる。フィブリノゲン中の RGD トリペプチドは、グリシン部分でペプチド鎖が大きく折れ曲がっている  $\beta$ -ターン構造を有する。この  $\beta$ -ターン構造を設計分子上に忠実に再現させ、血小板凝集抑制作用を有するペプチドミミック化合物を創出した。この化合物を、本研究の基本となるプロトタイプ化合物に設定した。

第二章では、このプロトタイプ化合物を基にして、その構造変換を行い、血小板凝集抑制注射剤の創出を行った。その結果、既存の血小板凝集抑制剤に見られる出血時間の延長という副作用が起こりにくい安全な血小板凝集抑制剤を創出した。

第三章では、同じプロトタイプ化合物を基にし、より投与しやすい血小板凝集抑制経口剤の創出研究について述べる。プロトタイプ化合物上での置換基変換、骨格変換により、より高い血小板凝集抑制能を有し、かつ良好な経口吸収性を有する薬剤の創出について述べる。更にプロドラッグ体への変換を行い、より経口吸収性の高い化合物の創出について述べる。

第四章では本研究の総括及び今後の展望を行う。



## 本 論

### 第1章 フィブリノゲン RGD ペプチドを模した血小板凝集抑制剤プロトタイプ化合物の創出

#### 1. 1. 血小板凝集抑制作用を有する分子骨格の設計

抗血小板剤の創出にあたり、まずプロトタイプ化合物と呼ばれる血小板の凝集を効果的に抑制する化合物の基本骨格を構築する必要があった。このプロトタイプ化合物を分子設計するため、序論で述べた血小板二次凝集のメカニズムを更に精査した。血小板表面には血小板凝集に関わる膜糖蛋白であるグリコプロテイン IIb/IIIa (Glycoprotein IIb/IIIa; GPIIb/IIIa) が存在する<sup>10)</sup>。GPIIb/IIIa の構造は Figure 7 に示す様に、2本のペプチド鎖、GPIIb 鎖、

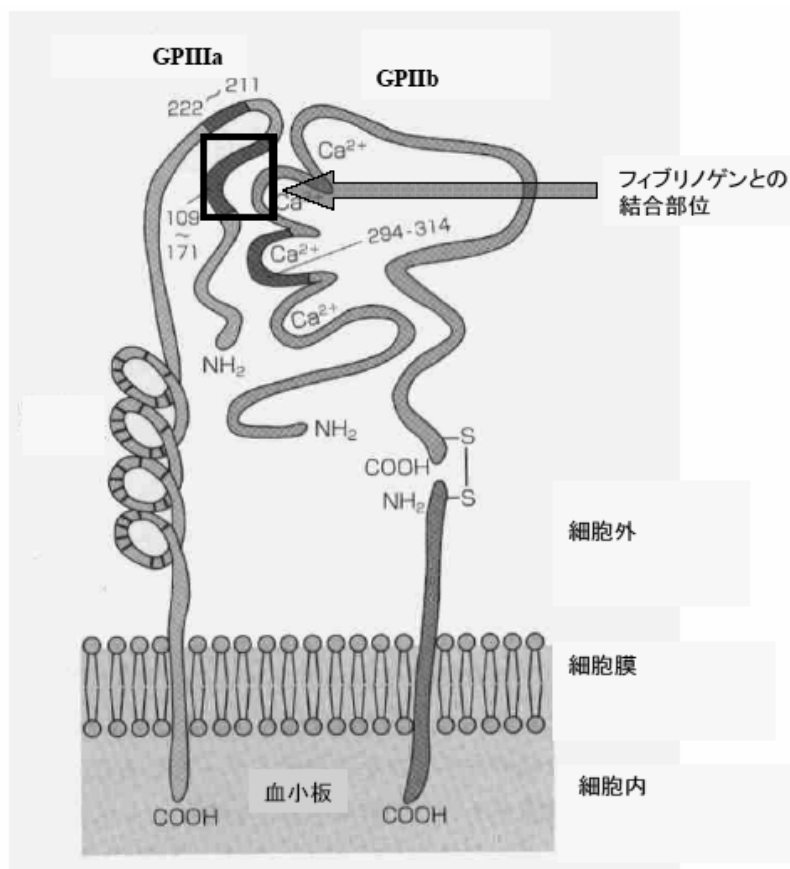
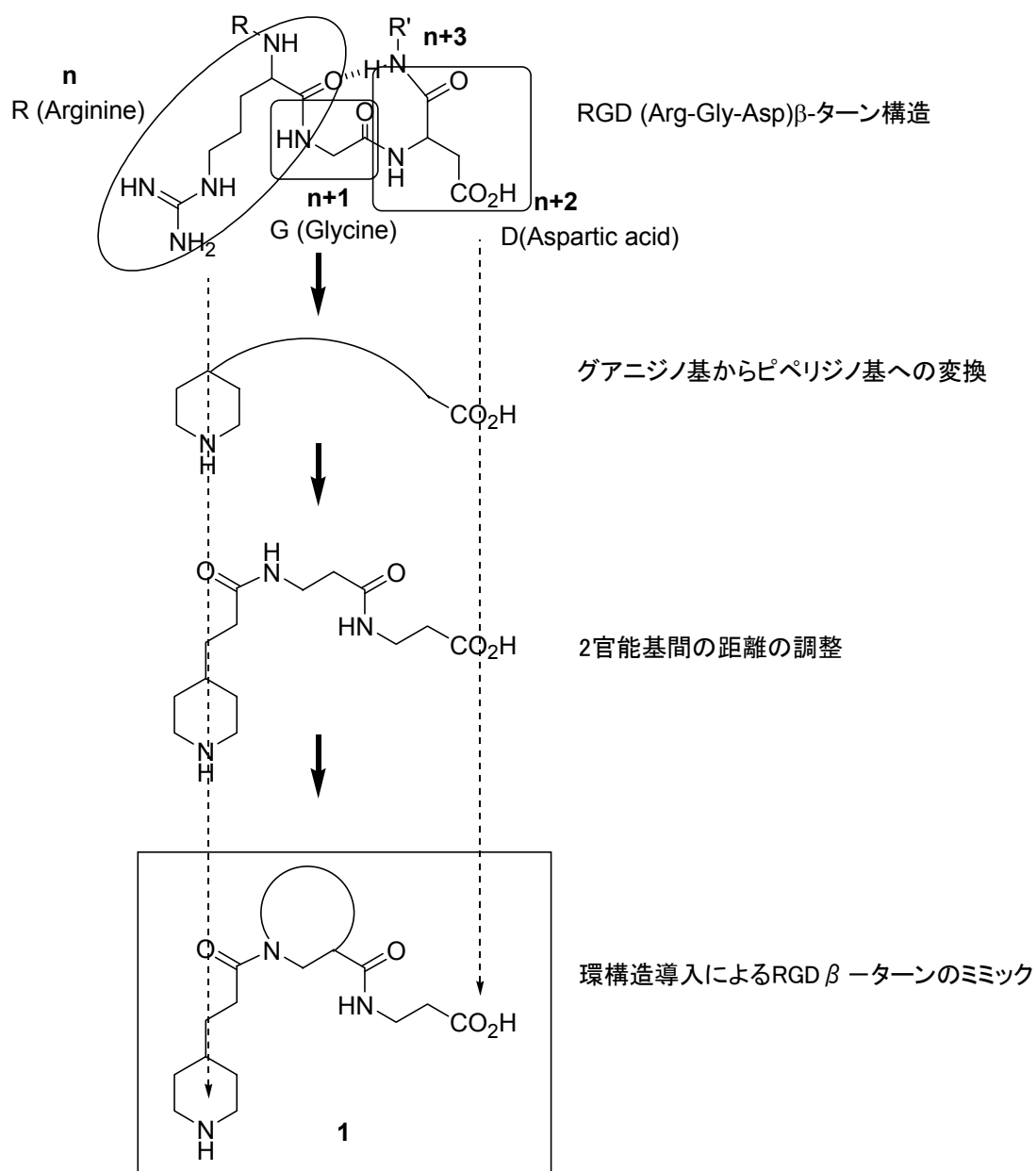


Figure 7. The structure of GPIIb/IIIa (GPIIb/IIIaの構造)

GPIIIa 鎖が血小板細胞膜から膜外に突き出しており、Ca<sup>2+</sup>結合を介して、お互いに会合した状態を取っている。この蛋白は定常状態では受容体機能を発現していないが、血小板粘着を起点とする各種アゴニストによる刺激により立体構造が変化し、活性型 GPIIb/IIIa 複合体となる。この活性化を受けた GPIIb/IIIa は血漿蛋白の一つであるフィブリノゲンと結合する機能を発現し、血栓を形成する (Figure 6 参照)。この際、GPIIb/IIIa がフィブリノゲンと結合する部位は、GPIIIa 鎖の 109 番から 171 番の部分であることが分かっている<sup>19)</sup>。一方、粘着性蛋白であるフィブリノゲンは分子量約 34 万の水溶性蛋白であり、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  鎖の 3 本のサブユニットが N 末端付近で S-S 結合をし、それらが対を成したダイマー構造を有している<sup>17)</sup>。GPIIb/IIIa は、このフィブリノゲンの  $\alpha$  鎖 95-97 番目、および 572-574 番目のアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (Arg-Gly-Asp; 以下 RGD) 残基部分を特異的に認識し接着する<sup>20)</sup>。この RGD 構造のアルギニンには塩基性置換基であるグアニジノ基が存在し、またアスパラギン酸部分には酸性置換基であるカルボキシル基が存在する。これらの置換基が GPIIb/IIIa 中の官能基とそれぞれ静電的な相互作用により結合し、血小板凝集が起こる。著者は、この GPIIb/IIIa と親和性の高いフィブリノゲン  $\alpha$  鎖の RGD 構造に注目した。すなわち、この構造を基にした分子設計により、より強力に GPIIb/IIIa に拮抗する非ペプチド性小分子化合物が合成できるならば、優れた抗血小板剤プロトタイプ化合物を見出すことができると思った<sup>21)</sup>。この仮説を基にプロトタイプ化合物の分子設計を行うことにした。

分子設計に先立ち、フィブリノゲン  $\alpha$  鎖に存在する RGD の立体構造を精査した。Figure 8 に示す様に、 $\alpha$  鎖の RGD 構造は、グリシン部分でペプチド鎖が大きく折れ曲がっている  $\beta$ -ターン構造を有している<sup>18)</sup>。 $\beta$ -ターンとは、 $n$  番目のアミノ酸残基のカルボニル酸素原子と  $n+3$  番目のアミノ酸残基のアミドプロトンが水素結合を形成することにより安定した折れ曲がり構造を意味する。フィブリノゲン RGD 部分では  $n$  番目がアルギニン、 $n+1$  番目がグリシン、 $n+2$  番目がアスパラギン酸残基に相当する。 $\beta$ -ターン構造では、折れ曲がり構造のゆえに、立体的に小さいアミノ酸が  $n+1$  番目を占めるのが一般的であるが、この場合も、 $n+1$  番目に相当するアミノ酸残基は立体的に小さなグリシンが占めている。著者は、この RGD  $\beta$ -ターン構造を立体的に忠実に再現した非ペプチド性小分子を設計することとした (Figure 8)。まず、GPIIb/IIIa による認識に必須である 2 つの官能基、すなわちグアニジノ

ノ基、およびカルボキシル基に相当する塩基性置換基及び酸性置換基官は、本研究の設計分子にも必須である。しかし、アルギニンに存在するアルキルグアニジンは塩基性度が非常に高く、設計小分子にそのまま導入した場合、非選択的な蛋白相互作用を起こす恐れがある。また、塩基性置換基のコンフォメーションもある程度制御出来た方が受容体側のアミノ基受容サイトとの相互作用が強くなるため、活性の向上が見込まれるのではないかと



**Figure 8.** The drug design based on the RGD  $\beta$ -turn structure (RGD  $\beta$ -ターン構造を基礎としたドラッグデザイン)

考えた。このような仮説により、設計小分子にはアルキルグアニジノ基をそのまま導入するのではなく、2級環状アミンである4-ピペリジノ基を導入することとした。このグアニジン等価体としての4-ピペリジノ基の導入は Merck のグループらによっても報告された<sup>22)</sup>。カルボン酸側は、そのままカルボシキル基を取り入れても問題ないと判断し、カルボキシシル基とピペリジン基の2つの官能基をそれぞれ設計小分子の両端に配置した。次に、2つの官能基間の距離を制御した。RGDのトリペプチドの場合、グアニジノ末端アミノ基のN原子から、カルボキシシル基末端カルボニル基のC原子まで15原子が存在する。この15原子分に相当する長さ近づけるため、設計小分子の主鎖原子数も15個として分子長を調節した。更に、アミド結合を2箇所導入することで、分子に極性を持たせ、受容体との親和性の向上を図った。次に、この分子設計の最も重要な点となるRGDβ-ターン構造の折れ曲がり再現するため<sup>23)</sup>、分子内に環状構造β-アミノ酸を導入する設計を行った。すなわち、環状構造にすることにより両末端の活性発現に必須な官能基がより固定化され、RGDペプチド自身が有する適切な配置に近づくことができるとの考え方で、分子の中央部分に環構造を導入した小分子**1**を設計した。しかし、ここで一点、重要な問題が浮上した。蛋白構造を知る上で最も確実な測定方法であるX線構造解析によりフィブリノゲンα鎖に存在するRGDβ-ターンの折れ曲がり角度が決定されておらず、実際どれほどの角度で屈折しているのかが明確でない。すなわち、設計小分子**1**の最適折れ曲がり角度が明確にならなかった。そこで、著者は、この折れ曲がりに対応する環状構造部分に、Figure 9に示す5員環から8員環に至る環状β-アミノ酸構造を組み込んだ非ペプチド性小分子(**1a-1f**)を設計した。小さな環構造であれば、その2官能基のなす角度は小さく、2官能基間の距離も小さくなる。環構造が大きくなればなるほど、2官能基のなす角度は大きくなり、2官能基間の距離も広がる。7員環及び8員環環状構造誘導体の環内に2重結合を組み込むことで、環の自由度がある程度制御できる。これらの効果が、血小板凝集抑制活性にどのような影響を与えるかという点も検証することとした。そこで、まず、これら設計分子(**1a-1f**)をラセミ体の形で合成することにした(Figure 9)。この中で最もRGDβ-ターン構造の折れ曲がり角度と2官能基間距離をより良く再現できた化合物が、最も高い血小板凝集抑制能を示すはずである。さらに、これら環状構造部分に存在する不斉炭素を制御することにより、カルボ

キシル基末端側を紙面上側と下側どちらかに制御することが可能である。設計ラセミ化合物の中で、最も薬理プロファイルのよい化合物の光学活性体を合成し、GPIIb/IIIa はどちらの光学異性体をより高く認識するのかを実証し、そのことを基としてプロトタイプ化合物を選定することにした。

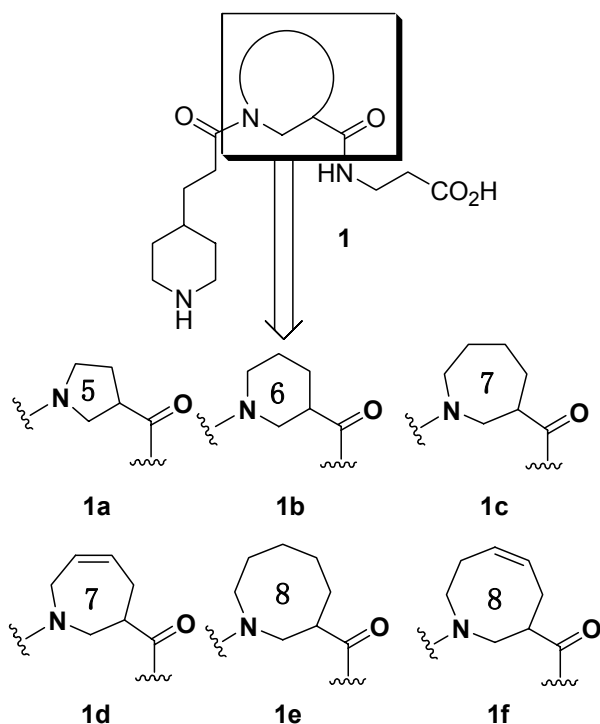
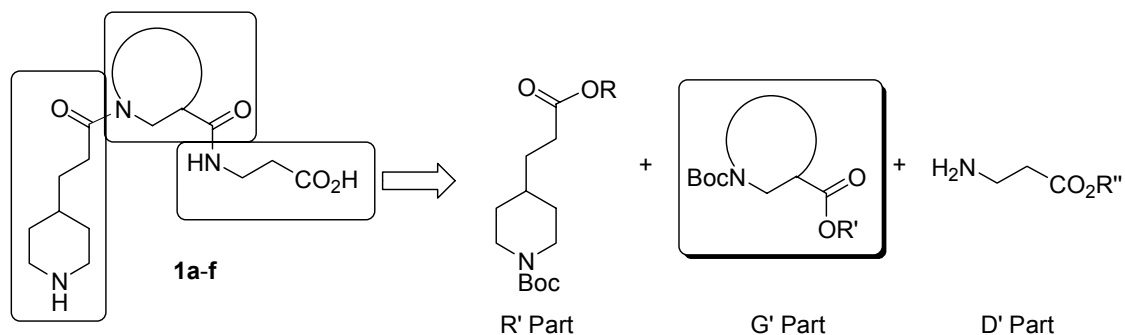


Figure 9. The mimetics of  $\beta$ -turn ( $\beta$ -ターン構造の擬似変換)

1. 2. RGD  $\beta$ -ターンを模したプロトタイプ候補化合物の合成

1. 2. 1. プロトタイプ候補化合物の合成スキーム



Scheme 1. The retro-synthesis of RGD mimetics **1a-f**

前節で設計したプロトタイプ候補化合物 **1a-f** の逆合成を Scheme 1 に示す。設計分子にはアミド結合が2ヶ所ある。これらのアミド結合部分で分けた各パート (**R'**, **G'**, **D'** パート) をそれぞれ合成する。購入可能なものはそのまま使用することとした。各パートを縮合、保護基を脱保護し、目的物へ導くルートの設定により化合物 **1a-f** を合成する。この逆合成スキームで問題となったのは、**G'** パートである  $\beta$ -ターンミミック部分の合成である。5員環、6員環  $\beta$ -アミノ酸誘導体は購入可能であったが、7員環以上の環状  $\beta$ -アミノ酸合成法は、古典的な方法<sup>24)</sup>による7員環  $\beta$ -アミノ酸誘導体を除いて、ほとんど報告例がない<sup>25)</sup>。そこで、一般的な中員環  $\beta$ -アミノ酸誘導体の合成法を確立する必要が生じた。著者は、本研究で先ず、この新規環状  $\beta$ -アミノ酸合成法を構築した。次項にこれらの合成法を示す。

### 1. 2. 2. 中員環 $\beta$ -アミノ酸ラセミ誘導体の合成<sup>26)</sup>

Figure 10 に示す Grubbs らによって開発されたルテニウムカルベン錯体 **2, 3** を触媒に用いた分子内閉環メタセシス反応を用いて **G'** パートに相当する中員環  $\beta$ -アミノ酸の合成を行った。Grubbs 触媒を用いた閉環メタセシス反応は、ジエン体から様々な環状化合物を得る大

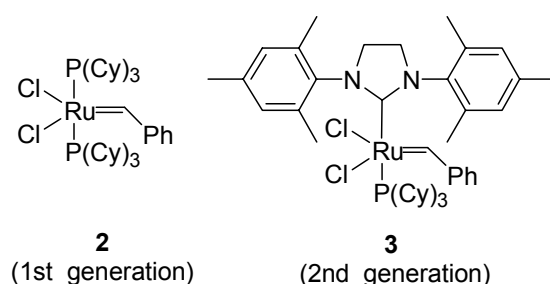


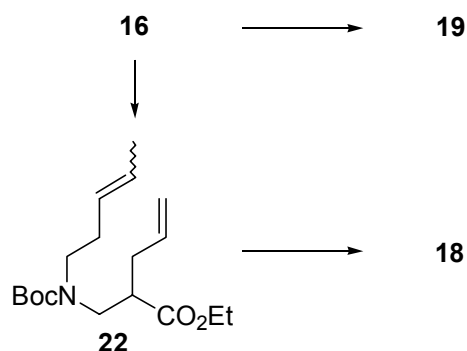
Figure 10. Grubbs' catalyst

変有用な反応である。官能基許容性も大きく、近年様々な環状化合物合成の鍵反応に利用されている<sup>27)</sup>。著者はこの反応を用いて、7員環から9員環のラセミ  $\beta$ -アミノ酸誘導体の合成に着手した (Scheme 2)。メタセシス反応の基質となるジエン体 **14-16** を以下のようにし

て合成した。1-ブロモ-3-ブテン (**4**) または 1-ブロモ-4-ペンテン (**5**) に炭酸セシウムを塩基とし、ヨウ化リチウム触媒存在下、イミノジカルボン酸ジ-*tert*-ブチルを作用させ、*N,N*-di-Boc アルケニルアミン体 **6, 7** を得た<sup>28)</sup>。化合物 **6, 7** はそれぞれ塩酸で Boc 基を脱保護し、1-アミノ-3-ブテン (**8**) または 1-アミノ-4-ペンテン (**9**) をそれぞれ塩酸塩の粉末として得ることができた。次に、アリルアミン (**10**) 及びアルケン **8, 9** にアクリル酸エチルを共役付加 (**8, 9** の場合はトリエチルアミンを共存) させた後、アミノ基の Boc 保護を行い、エステル化合物 **11-13** とした。このエステル基の  $\alpha$ 位を  $\text{LiN}(\text{TMS})_2$  を用いてリチウムエノラートに変換した後、ヨウ化アリルを作用させてジエン体 **14-16** を得た。このジエン **14-16** を 2 種の Grubbs 触媒 **9, 10** による閉環メタセシス化反応に付した。詳細な結果を Table 2 に示す。第一世代 Grubbs 触媒 **2** (10 mol%) を用いて、基質 **14, 15** を無水塩化メチレン溶媒中で加熱還流した。2 時間で環化反応は完結し、対応する 7 及び 8 員環閉環化合物 **17, 18** をそれぞれ 90% 収率で得ることができた。空気中でも取り扱いの容易な第二世代 Grubbs 触媒 **3** を用いると、収率は 97-98% まで向上した。しかし、ジエン **16** を触媒 **2** を用いて閉環し、9 員環  $\beta$ -アミノ酸誘導体 **19** を得る反応では収率が大幅に低下した。これは **16** のジエン部分が立体的に閉環しにくい配置となることに起因すると考えられる。また、**16** の反応では分子間でメタセシス反応を起こした 2 量体とともに、8 員環  $\beta$ -アミノ酸誘導体 **18** が約 5% 副生してることが分かった。これはジエン **16** の閉環メタセシス反応と競争する形で 2 重結合が異性化を起こした後、閉環メタセシス反応を起こすためであると考えられる (Scheme 3)<sup>29)</sup>。以上の結果より、著者はこのメタセシス反応の限界は 9 員環形成反応であることを突き止めた。次に、7 員環および 8 員環  $\beta$ -アミノ酸誘導体 **17, 18** を塩酸ガスを吹き込んだ酢酸エチル溶液で Boc 基の脱保護を行い、 $\beta$ -アミノ酸エステル **20, 21** に誘導し、化合物 **1** の合成における G' パートとして使用した (1.2.4. 参照)。ここで述べた閉環メタセシス化反応を基軸とし、光学活性環状  $\beta$ -アミノ酸の不斉合成法を展開した。



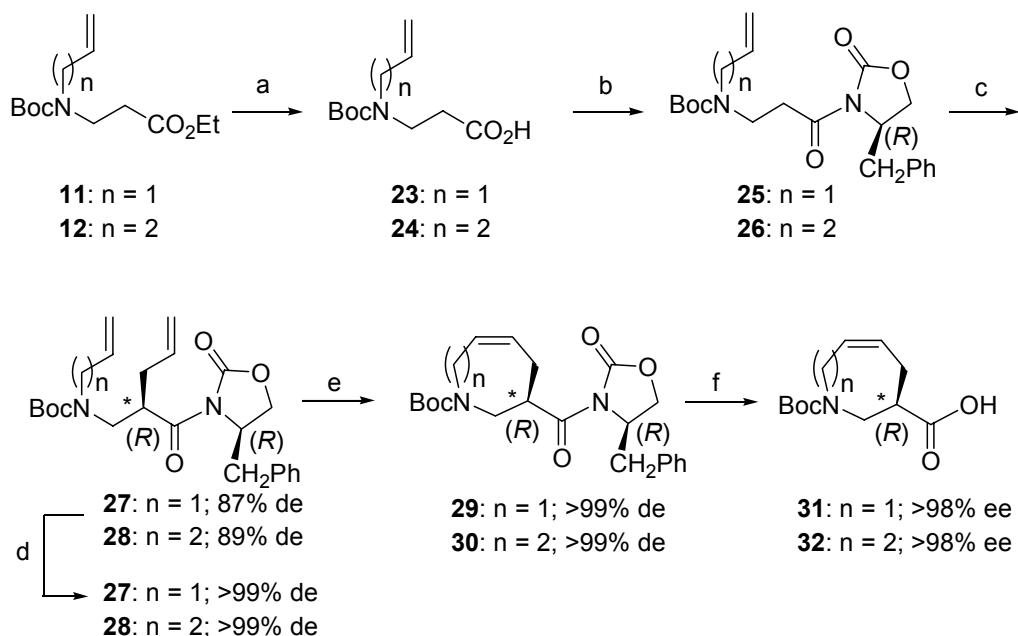




**Scheme 3.**

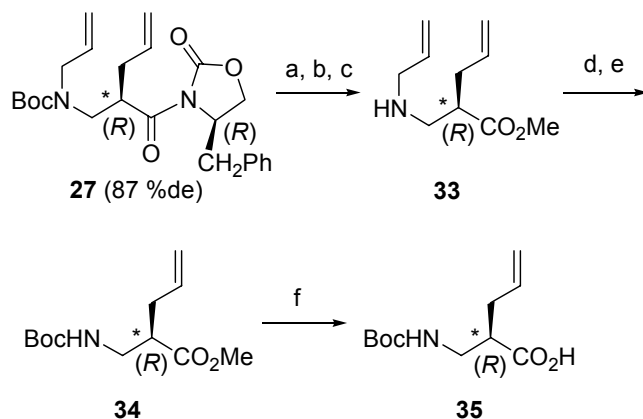
1. 2. 3. 中員環  $\beta$ -アミノ酸の不斉合成

前項で示した方法により光学活性中員環  $\beta$ -アミノ酸誘導体を得るには、エステル **11**, **12** でのカルボエトキシ基  $\alpha$  位にアリル基を立体選択的に導入する必要がある。そこで著者は、



**Scheme 4.** Reagents and conditions: (a) 1 N aq NaOH, THF, EtOH, rt; (b) <sup>t</sup>BuCOCl, Et<sub>3</sub>N, THF, then (*R*)-4-benzyl-2-oxazolidinone, <sup>n</sup>BuLi, 60% for **25**, 79% for **26** in 2 steps; (c) NaN(TMS)<sub>2</sub> (1.1 eqiv), THF, -78 °C, then allyl iodide (3.5 eqiv) allowed to warm to 0 °C, 71% for **27**, 68% for **28**; (d) medium pressure column chromatography on silica gel, 64% for **27**, 57% for **28** from **25**, **26**; (e) **3** (10 mol%), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux, 97% for **29**, 96% for **30**; (f) LiOOH, THF, 0 °C, 87% for **31**, 93% for **32**.

Evans らが開発した光学活性オキサゾリジノン基をキラル助剤に持つ誘導体 **25**, **26** のジアステレオ選択的アリル化反応を応用することとした<sup>30, 31)</sup>。ここでの基質となる化合物 **25**, **26** の合成法を Scheme 4 に示す。エステル **11**, **12** のエステル部分をアルカリ加水分解し、カルボン酸 **23**, **24** とした。この **23**, **24** をそれぞれピバロイルクロリドによる混合酸無水物法により、カルボン酸を酸無水物とした後、(4*R*)-ベンジルオキサゾリジノンのリチウム塩と反応させ、アシル体 **25**, **26** を得た。次に、**25**, **26** を -78 °C で NaN(TMS)<sub>2</sub> と反応させ、系中でナトリウムエノラートを生成させた後、同温度でヨウ化アリルを滴下し、ジアステレオ選択的なアリル化反応を行った。その結果、**25** からは 87% de で **27** を、**26** からは 89% de で **28** を得た。これらの粗生成物は中圧カラムクロマトグラフィーによりそれぞれ単一ジアステレオマーに精製できた。単一ジアステレオマーの **27**, **28** を、それぞれ Grubbs 第二世代触媒 (**3**) を用いて閉環メタセシス化反応に付し、対応する 7 員環及び 8 員環誘導体 **29**, **30** を光学純度の低減を伴うことなく好収率で得ることができた。続いて、キラル助剤であるオキサゾリジノン基をリチウムヒドロペルオキシドによる加水分解法により除去<sup>32)</sup>し、7,8 員環 β-アミノカルボン酸 **31**, **32** を 98% ee 以上の光学純度で得ることに成功した。生成した光学活性 β-アミノ酸誘導体 **31** の絶対配置は Scheme 5 に示す方法により決定した。アリル基をジアステレオ選択的に導入したジエン体 **27** (87% de) に、氷冷下でリチウムヒドロペルオキシドを作用させ、オキサゾリジノン基を除去し、カルボン酸を得た<sup>32)</sup>。このカルボキシル基をトリメチルシリルジアゾメタン<sup>33)</sup> (TMSCHN<sub>2</sub>) と反応させ、メチルエステルとした後、Boc 基をトリフルオロ酢酸 (TFA) にて脱保護し、ジアリル体 **33** とした。続いて、**33** を Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 触媒存在下、*N*, *N'*-ジメチルバルビツル酸を作用させ、窒素原子に置換されたアリル基を除去した<sup>34)</sup>。その後、アミノ基を再度 Boc 保護し、モノアリル体 **34** を得た。最後に **34** のメチルエステルを水酸化リチウムにて加水分解し、文献既知の β-アミノ酸誘導体 **35** に誘導した。**35** の旋光度を比較することにより、**35** の不斉中心は (*R*) 配置であることが判明した<sup>35)</sup>。このことから β-アミノ酸誘導体 **31** に存在する不斉炭素の立体配置は (*R*) 配置であると決定した。この配置は Evans の不斉アリル化反応の機構から説明できる配置と同じであることを確認した。



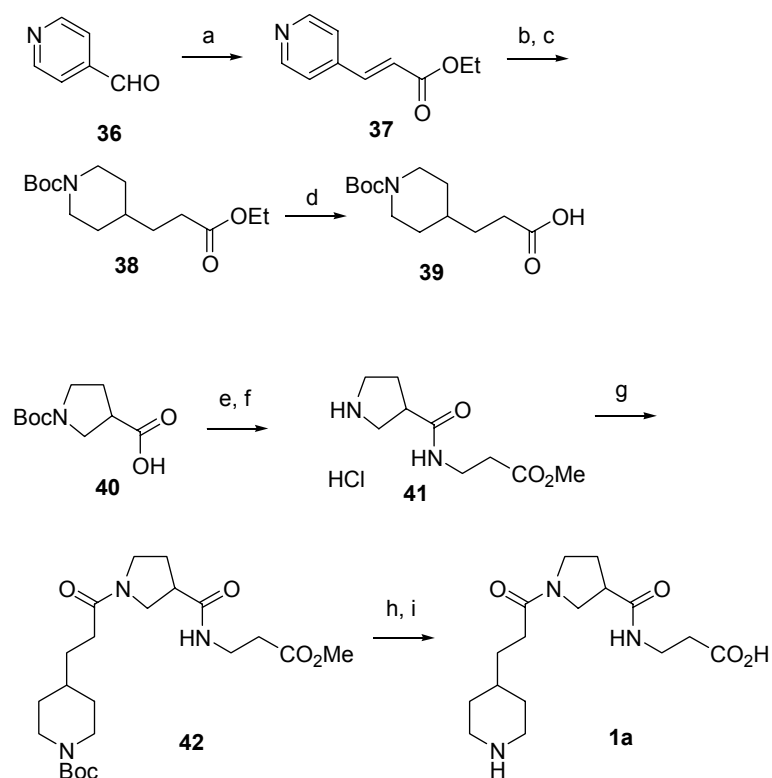
**Scheme 5.** Reagents and conditions: (a) LiOOH, THF, 0 °C; (b) TMSCHN<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, rt; (c) TFA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 32% in 3 steps; (d) cat. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, 3,5-dimethylbarbituric acid, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt; (e) (Boc)<sub>2</sub>O, 63% in 2 steps; (f) LiOH, THF, MeOH, rt, 82%; **35**: [α]<sup>26</sup><sub>D</sub> +11.0° (c 1.09, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

#### 1. 2. 4. プロトタイプ候補化合物の合成

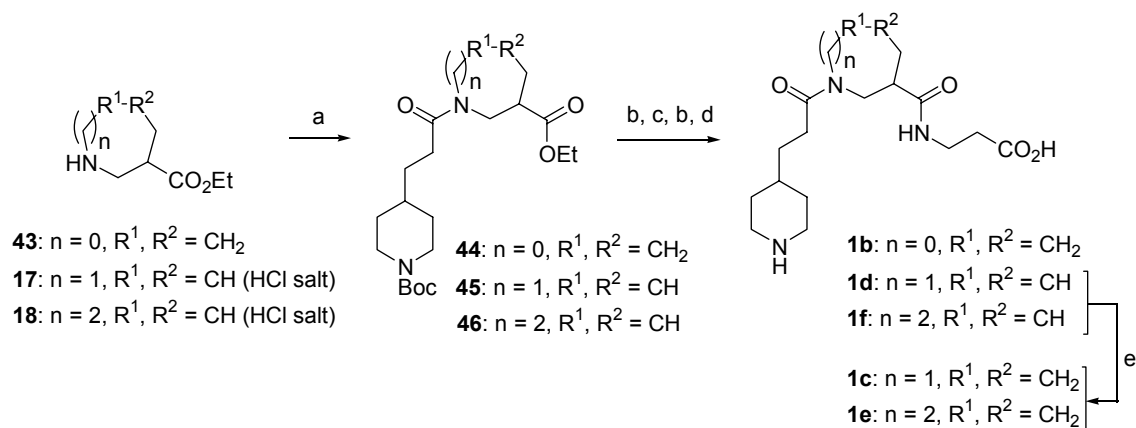
まず、プロトタイプ候補化合物 **1a** の合成を Scheme 6 に示す。4-ホルミルピリジン (**36**) を Horner-Emmons タイプの Wittig 反応により α, β-不飽和エステル誘導体 **37** とした後、酸化白金触媒による常圧での水素添加反応により 2 重結合及び、ピリジン環を同時に還元した。生成したピペリジン環上の窒素原子を Boc 基で保護し **38** とし、エチルエステルのアルカリ加水分解を経て、**39** を得た。

5員環β-アミノ酸誘導体 **40** (市販品) を 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (EDC)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (HOBT) 共存下で、β-アラニンメチルエステルと縮合させた後、Boc 基を塩酸により脱保護し、**41** へと導いた。**39** と **41** を再び EDC, HOBT 共存下で縮合し **42** とした後、エステル基のアルカリ加水分解、塩酸による Boc 基の脱保護を経て、5員環誘導体 **1a** へと導いた。

次に、プロトタイプ候補化合物 **1b-f** の合成を行った (Scheme 7)。Scheme 2 に従い得られた **17**, **18** および購入品である 6員環 β-アミノ酸誘導体 **43** はそれぞれカルボン酸 **39** と EDC, HOBT 共存下で縮合し、**44-46** へと誘導、エチルエステル基のアルカリ加水分解後、生成し



**Scheme 6.** Reagents and conditions: (a)  $(\text{EtO})_2\text{POCH}_2\text{CO}_2\text{Et}/\text{NaH}$ , THF, 78%; (b)  $\text{PtO}_2/\text{H}_2$ , EtOH; (c)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ , 81% in 2 steps; (d) 1 N NaOH, 91%; (e)  $\beta\text{-AlaOMe HCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , EDC HCl, HOBT, DMF, (f) HCl, AcOEt 99% in 2 steps; (g) **39**, EDC HCl, HOBT,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF; (h) 1 N LiOH, (i) HCl, AcOEt 91% in 2 steps.



**Scheme 7.** Reagents and conditions: (a) **39**, EDC, HOBT,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMF, 74% for **44**, 68% for **45**, 86% for **46**; (b) 1 N LiOH; (c)  $\beta\text{-AlaOMe HCl}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ , EDC HCl, HOBT, DMF; (d) HCl, AcOEt, 57% for **1b**, 53% for **1d**, 68% for **1f** in 4 steps; (e)  $\text{PtO}_2/\text{H}_2$ , EtOH, 86% for **1c**, 89% for **1e**.

たカルボン酸中間体を  $\beta$ -アラニンメチルエステルと EDC, HOBT 共存下にて再縮合し、エ

ステル加水分解、続いて Boc 基を塩酸により脱保護し、**1b**, **1d**, **1f** へと導いた。このうち不飽和環状誘導体 **1d**, **1f** については酸化白金触媒存在下、水素添加反応により 2 重結合を還元し、飽和環状誘導体 **1c**, **1e** に誘導した。

### 1. 3. プロトタイプ候補化合物の生物活性評価

#### 1. 3. 1. 血小板凝集抑制率 (IC<sub>50</sub>)の測定法

前節で合成したプロトタイプ候補化合物 **1a-f** の血小板凝集抑制能は 50%血小板凝集を抑制するときの薬剤濃度、half inhibition concentration (IC<sub>50</sub>; M) の測定により評価した。この値が小さければ、薬剤濃度が低濃度で薬効を示すことを意味する。すなわち、高活性を有する薬剤であることが分かる。測定法を Figure 11 に示す<sup>36)</sup>。ボランティアより得られた人の血小板を含んだ血漿成分をセルに入れ、光の透過度を測定する。このときの光の透過度を T<sub>0</sub> とする。次に、この血漿成分に、37 °Cにて血小板活性化アゴニストの一つである アデノシン二リン酸 (adenosine diphosphate; ADP) をセル内の濃度が 2.5 μM となるよう注入する。

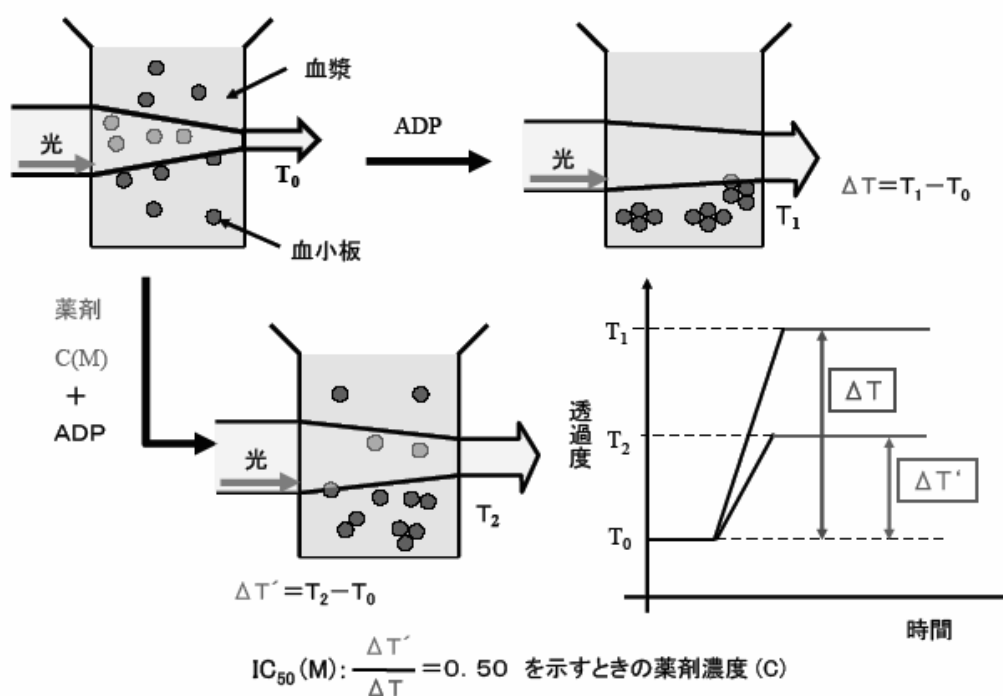


Figure 11. The measurement of platelet aggregation inhibitory IC<sub>50</sub> (血小板凝集抑制 IC<sub>50</sub>の測定法)

この操作により血漿中に存在する血小板は完全に凝集する。凝集した血小板は血漿中から沈降するため、光透過度は凝集前の場合よりも向上する。この光透過度  $T_1$  を測定し、 $T_0$  との差を  $\Delta T = T_0 - T_1$  とする。次に、血漿の入ったセル中に、測定する薬剤を種々の濃度  $C$  (M) であらかじめ投入しておき、そこに ADP を上記と同濃度で注入する。この場合、薬剤が存在するため、血小板は部分凝集抑制を起こす。そのため、光透過度は  $T_1$  と  $T_0$  の間の  $T_2$  という値を得る。同様に  $T_0 - T_2$  の値を算出し、この値を  $\Delta T'$  とする。ここで算出した  $\Delta T$ ,  $\Delta T'$  の値は血小板凝集率に比例するので  $IC_{50}$  値は  $\Delta T' / \Delta T = 0.50$  を示すときの薬剤濃度となる。これを算出することにより、 $IC_{50}$  値を決定した。

### 1. 3. 2. プロトタイプ候補化合物の血小板凝集抑制率

前項の評価法により算出したプロトタイプ化合物の  $IC_{50}$  値を Table 3 に示す。 $\beta$ -ターンを模した設計小分子 **1a-f** の  $IC_{50}$  は  $10^{-6} - 10^{-7}$  M の値を示した。フィブリノゲン蛋白中の GPIIb/IIIa との結合部位である RGD トリペプチドの  $IC_{50}$  値の測定を行ったところ、 $5.0 \times 10^{-5}$  M という大変弱い活性を示すに過ぎなかった。これはフィブリノゲン蛋白から切り離された RGD トリペプチドのみでは活性発現に必須な  $\beta$ -ターン構造を形成することができず、そのため GPIIb/IIIa との親和性が大きく低下しているものと推測できる。この結果からも、GPIIb/IIIa との高い親和性を実現するには、設計小分子に立体的な制御が不可欠であることが示唆された。本研究で合成した  $\beta$ -ターン擬似化合物の中で、5員環誘導体 **1a** は殆ど活性を示さず、また7員環不飽和誘導体 **1d** 及び、8員環飽和誘導体 **1e** は弱い活性を示すに過ぎないが、6員環誘導体 **1b**、7員環飽和誘導体 **1c** 及び、8員環不飽和誘導体 **1f** は中程度の活性を示す事が分かった。このなかで最も活性の強いのは7員環飽和誘導体 **1c** で、その  $IC_{50}$  値は  $3.2 \times 10^{-7}$  M であった。しかし、6員環誘導体 **1b** ( $5.7 \times 10^{-7}$  M)、及び8員環不飽和誘導体 **1f** ( $4.6 \times 10^{-7}$  M)との  $IC_{50}$  値との差は1.8倍以内と、それほど乖離は見られなかった。これら **1c**、**1b**、及び **1f** の中から薬剤創出の基になるプロトタイプ化合物を選定するにあたり、この Table 3 の活性値と、原料の入手のしやすさ、合成コスト、および最終的に環上の不斉炭素の制御も考慮した結果、基本骨格 **1b** をプロトタイプ化合物に選択するのが最も

**Table 3.** IC<sub>50</sub> value for platelet aggregation inhibition of **1a-f**.

Compd	IC <sub>50</sub> , <sup>a</sup> M
RGD	5.0 x 10 <sup>-5</sup>
<b>1a</b>	>1.0 x 10 <sup>-6</sup>
<b>1b</b>	5.7 x 10 <sup>-7</sup>
<b>1c</b>	3.2 x 10 <sup>-7</sup>
<b>1d</b>	9.9 x 10 <sup>-7</sup>
<b>1e</b>	8.4 x 10 <sup>-7</sup>
<b>1f</b>	4.6 x 10 <sup>-7</sup>

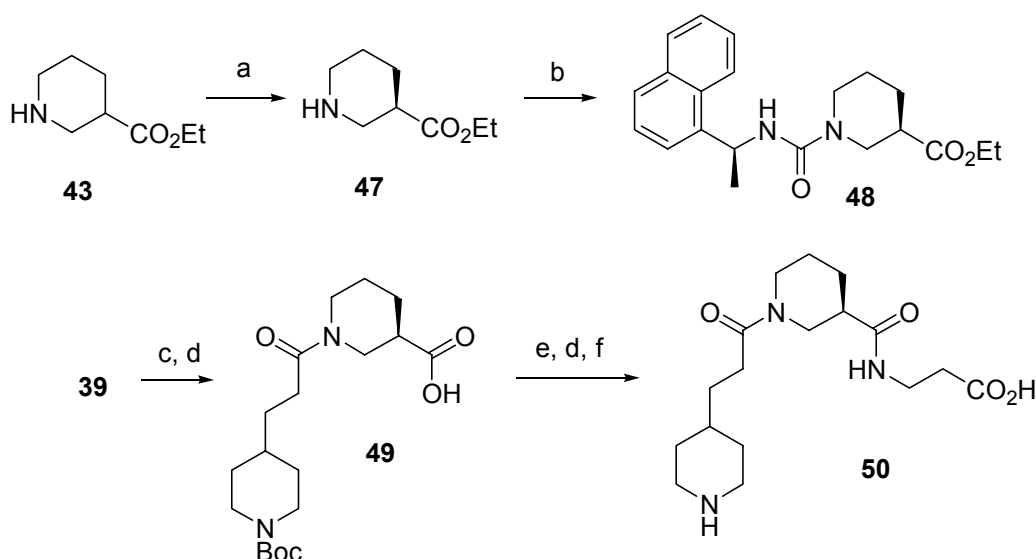
<sup>a</sup> Concentration required to reduce binding ADP-induced human platelet aggregation response by 50%

望ましいという結論に達した。なぜならば、**1c**、**1f**では、Scheme 2 及び 3 に示す多段階反応を経て環状β-アミノ酸 **31**, **32** を得る必要があるのに対し、6員環誘導体 **1b** は大量に購入可能であり、さらに次項で述べるようにジアステレオマー塩を利用する光学分割法により光学活性体も容易に入手可能であるからである。これまでの評価では、ラセミ体の **1b** を使用した。実際には光学異性体 (*R*)と(*S*)体の間で、血小板凝集抑制能に差が見られるはずである。そこで、どちらの立体異性体がより活性が強いのかを決定するため、**1b** の光学活性体の合成を行った。

#### 1. 4. 光学活性プロトタイプ候補化合物の合成

環状β-アミノ酸を有する光学活性プロトタイプ候補化合物 **50** の合成を Scheme 8 に示す。まず、購入可能なラセミ体ニペコチン酸エチル (**43**)を文献記載の方法に従い、光学分割を行った<sup>37)</sup>。すなわち、**43** と L-酒石酸の、1:1 のジアステレオマー塩の分別再結晶をエタノールを用い3回行い、光学的に純粋な結晶の塩を得た。L-酒石酸を炭酸カリウム水溶液を用いて除去し、光学的に純粋な (*R*)-ニペコチン酸エチル (**47**)を酢酸エチルからの抽出により得た。この化合物の光学純度は、(*S*)-(+)-1-(1-ナフチル)エチル イソシアネート を用いてウ

レア誘導体 **48** に導いた後、そのジアステレオマー比を HPLC により測定し、>99%以上の光学純度であることを確認した。前項 1.2.4.の Scheme 7 で述べた **1b** の合成法に従い、光学的に純粋な **47** を **49** に導き、光学活性体 **50** を合成した。



**Scheme 8.** Reagents and conditions: (a) L-tartaric acid, recrystallization from EtOH (x 3),  $K_2CO_3$ , 20%; (b) (S)-(+)-1-(1-naphthyl)ethyl isocyanate; (c) **47**, EDC, HOBT,  $Et_3N$ , DMF; (d) 1 N LiOH, 77% in 2 steps; (e)  $\beta$ -AlaOMe HCl,  $Et_3N$ , EDC HCl, HOBT, DMF; (f) HCl, AcOEt, 89% in 3 steps.

#### 1. 5. 光学活性プロトタイプ候補化合物の血小板凝集抑制作用とプロトタイプ化合物の決定

第二項での測定法と同様の方法で血小板凝集抑制作用を測定した。その結果、6員環骨格上の不斉炭素が (R)配置を有する誘導体 **50** の血小板凝集抑制作用はラセミ体の活性と比較してほぼ倍増することが分かった (Table 4)。したがって **1b** の光学異性体のうち (R)配置の **50** が活性本体であることが分かった。以上の結果から、化合物 **50** をプロトタイプ化合物に選定し、プロトタイプ化合物の最適化を行った。結果については次章で述べる。



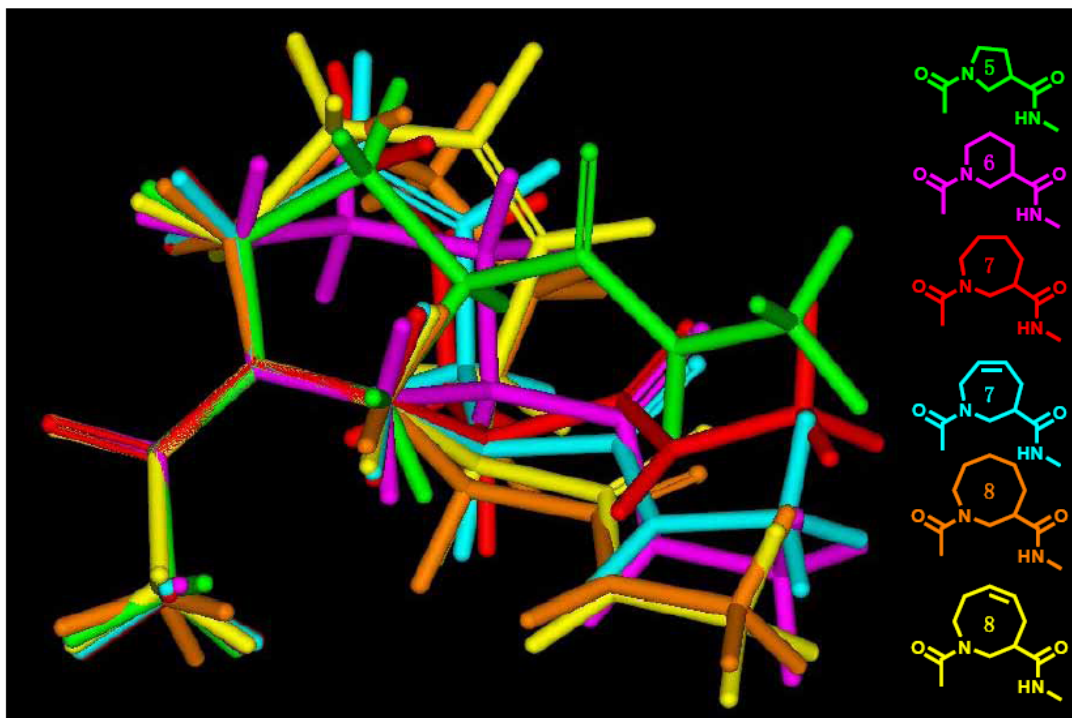
**Table 4.** The comparison of IC<sub>50</sub> value between **1b** and **50**

Compd	IC <sub>50</sub> , <sup>a</sup> M
<b>1b</b> (Racemate)	5.7 x 10 <sup>-7</sup>
<b>50</b> ( <i>R</i> )	2.4 x 10 <sup>-7</sup>

<sup>a</sup> Concentration required to reduce binding ADP-induced human platelet aggregation response by 50%

## 1. 6. 考察

RGD β-ターンミメティックの分子設計、合成、薬理活性評価によりプロトタイプ化合物 **50** を見出すことができた。この誘導体 **50** を見出す過程で、著者は β-ターンを模倣化するため、各種環状 β-アミノ酸をグリシンに相当する位置に導入した (Figure 9)。その結果、5員環誘導体 **1a** において血小板凝集抑制活性が弱く、また 6員環誘導体 **1b**、7員環誘導体 **1c**、及び 8員環不飽和誘導体 **1f** に強い活性が見られた (Table 3)。この様に環状構造の違いにより、血小板凝集抑制作用の違いが見られたのは、環状 β-アミノ酸構造から出た 2 種の直鎖の方向がそれぞれの環状構造で違うためであり、それにより直鎖の両端に存在する 2 つの活性発現官能基が違う位置に来るためであると推測される。この化合物間でのずれを視覚化するため、G<sup>2</sup>-part の環状 β-アミノ酸誘導体部分の最安定化構造をコンピュータモデリングソフト SYBYL<sup>38</sup>)を用いて **1a-f** の環状 β-アミノ酸部分を重ね合わせた (Figure 12)。重ね合わせの方法は、Figure 12 に示した **1a-f** の環状構造を抜粋し、それぞれの最安定化コンフォメーションを計算し、更にそれぞれの分子の窒素原子およびその両隣の炭素原子を重ね合わせた。すなわち、窒素原子から出る直鎖を同じ方向に重ねた場合、化合物間でカルボキシル基側の直鎖がどれ程のずれを生じるかを示した。ここでは不斉中心は (*R*)配置に統一して計算し、重ねあわせを行っている。その結果、5員環誘導体 (緑色)がカルボン酸側鎖の出る方向が最も違っており、その他はよく似た配置に来ていることがわかる。5員環誘導体 **1a** の血小板凝集抑制活性が低いのは、この様に立体配座が他の誘導体と大きくずれたためである。



**Figure 12.** Stacked figure of cyclic  $\beta$ -amino acid derivatives (calculated by molecular modeling software package SYBYL (TRIOS Associates))

ることが推察できる。また環内の2重結合導入によるコンフォメーションが7員環誘導体で顕著に見られた (Figure 12、赤色と水色)。活性の強い7員環、8員環不飽和体、6員環については、構造上、良く似た位置に来ている訳ではないが、活性を発現するための両端官能基のついた側鎖の大きな自由度を考えた場合、この程度のずれはあまり活性に影響がないと考えられる。

### 1. 7. 小括

以上、本章で著者は、血小板上の蛋白 GPIIb/IIIa と親和性が高い非ペプチド性小分子 **50** を GPIIb/IIIa に結合し血小板凝集を引き起こす血漿蛋白フィブリノゲンの RGD  $\beta$ -ターン構造を基礎として、分子設計、合成し、血小板凝集抑制能を発現することを見出した。この **50** を基礎として、更なる活性の向上、また既存薬との差別化を目指した。それらの結果については、2章、3章で述べる。

## 1. 8. 実験の部

### 1. 8. 1. General

Melting points were determined with a BÜCHI 535. Proton NMR spectra were recorded on a Bruker BIOSPIN AVANCE400 or DPX200.  $\delta$  Values in ppm relative to tetramethylsilane are given. IR spectra were recorded with the compound (neat) on a sodium chloride disk or as KBr pellets or nujol suspension using HITACHI 260-10, or HORIBA FT-710. Mass spectra were recorded with Hewlett Packard 1100LC/MSD. High resolution mass spectra were recorded with micromass LCT. Results of elemental analysis were recorded with PERKINELMER 2400II.

### 1. 8. 2. Chemistry

**1-*N,N*-di(*tert*-Butoxycarbonyl)amino}-3-butene (6)** .<sup>27)</sup> To a solution of Di-*tert*-butyl iminodicarboxylate (16.3 g, 75.0 mmol) in 2-butanone (163 ml) were added 4-bromo-1-butene (**4**) (15.2 g, 112.5 mmol), CsCO<sub>3</sub> (48.9 g, 150 mmol), and LiI (0.50 g, 3.75 mmol) successively. The mixture was refluxed overnight. After cooling to room temperature, volatiles were evaporated in vacuo. To the residue was added water, and extracted with EtOAc. The organic phase was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with hexane/EtOAc (95:5) to give **6** (12.7 g, 61%) as a colorless oil: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.51 (s, 18H), 2.27-2.38 (m, 2H), 3.59-3.67 (m, 2H), 4.99-5.12 (m, 2H), 5.77 (ddt,  $J = 17.1, 10.4, 7.0$  Hz, 1H); MS (ESI)  $m/z$  294.2 (M+Na)<sup>+</sup>.

**1-*N,N*-di(*tert*-Butoxycarbonyl)amino}-4-pentene (7)**. This compound was prepared from **5** using a procedure similar to that employed for the preparation of **6** (97%): IR (neat) 1749, 1699,

1394, 1367, 1128, 858  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.50 (s, 18H), 1.54-1.74 (m, 2H), 2.01-2.11 (m, 2H), 3.53-3.60 (m, 2H), 4.94-5.09 (m, 2H), 5.78 (ddt,  $J = 17.0, 10.4, 6.6$  Hz, 1H); MS (ESI)  $m/z$  286.15 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**4-Butenylamine hydrochloride (8).** To a solution of **6** (12.7 g, 46.8 mmol) in dry EtOAc was added 4 N HCl in EtOAc (94 ml, 374 mmol), and the resulting mixture was stirred at room temperature for 4 h. The volatiles were evaporated in vacuo. To the residue was added  $\text{Et}_2\text{O}$ , and precipitates were collected on a glass filter, washed with  $\text{Et}_2\text{O}$ , and dried in vacuo to give **8** (4.85 g, 95%) as absorbent solid:  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2.28-2.39 (m, 2H), 2.70-2.87 (m, 2H), 5.07-5.20 (m, 2H), 5.80 (ddt,  $J = 17.1, 10.5, 6.5$  Hz, 1H), 8.06 (br-s, 3H).

**5-Pentenylamine hydrochloride (9).** This compound was prepared from **7** using a procedure similar to that employed for the preparation of **8** (89%):  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  1.58-1.73 (m, 2H), 2.03-2.14 (m, 2H), 2.70-2.78 (m, 2H), 4.98-5.11 (m, 2H), 5.80 (ddt,  $J = 17.0, 10.3, 6.5$  Hz, 1H), 8.12 (br-s, 3H).

**Ethyl 3-[allyl(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propanoate (11).** Ethyl acrylate (3.47 g, 34.6 mmol) was added to a solution of allyl amine (**10**) (1.98 g, 34.6 mmol) in EtOH (35 ml). The mixture was stirred for 9.5 h at room temperature, and then evaporated in vacuo. The residue was dissolved in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (35 ml), and  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (7.54 g, 34.6 mmol) was added thereto. The mixture was stirred for 2 h at room temperature, and then evaporated in vacuo. The residue was diluted with EtOAc, and washed successively with 10% aqueous  $\text{KHSO}_4$  solution twice, water, saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution, and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered and evaporated in vacuo. The

residue was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane (5:1) to give **11** (7.30 g, 82%) as a colorless oil: IR (neat) 2979, 1736, 1699, 1466, 1410  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.26 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.50 (s, 9H), 2.56 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.47 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 3.75-3.95 (m, 2H), 4.13 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 5.02-5.20 (m, 2H), 5.75 (ddt,  $J = 17.6, 9.5, 5.5$  Hz, 1H); MS (ESI)  $m/z$  258.12 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Ethyl 3-[3-buten-1-yl(*tert*-butoxycarbonyl)amino]propanoate (12).** This compound was prepared from **8** and  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.2 eq) using a procedure similar to that employed for the preparation of **11** (56%): IR (neat) 2978, 2933, 1734, 1697, 1471, 1415, 1163  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.26 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 2.22-2.32 (m, 2H), 2.56 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.27 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.46 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 4.14 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 5.00-5.11 (m, 2H), 5.76 (ddt,  $J = 17.1, 10.1, 6.9$  Hz, 1H); MS (ESI)  $m/z$  294.2 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

**Ethyl 3-[(*tert*-butoxycarbonyl)(4-penten-1-yl)amino]propanoate (13).** This compound was prepared from **9** and  $\text{Et}_3\text{N}$  (1.2 eq) using a procedure similar to that employed for the preparation of **11** (40%): IR (neat) 2978, 2933, 1736, 1697, 1477, 1415, 1367, 1167  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.26 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.50-1.75 (m, 2H), 1.98-2.09 (m, 2H), 2.56 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.20 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.46 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 4.13 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 4.95-5.08 (m, 2H), 5.81 (ddt,  $J = 17.0, 10.3, 6.5$  Hz, 1H); MS (ESI)  $m/z$  308.4 ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ .

**Ethyl 2-[[allyl(*tert*-butoxycarbonyl)amino]methyl]-4-pentenoate (14).** To a solution of **11** (3.86 g, 15.0 mmol) in THF (40 ml) was added 1N solution of  $\text{LiN}(\text{TMS})_2$  in THF (18.0 ml, 18.0 mmol) below  $-70$   $^\circ\text{C}$ . After stirring at  $-70$   $^\circ\text{C}$  for 30 min, allyl iodide (4.8 ml, 52.5 mmol) was added dropwise at  $-70$   $^\circ\text{C}$ . The mixture was then stirred at  $0$   $^\circ\text{C}$  for 40 min, quenched by

phosphate buffer solution (pH = 7) and extracted with EtOAc. The extract was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane (1:8) to give **14** (2.98 g, 67%) as a colorless oil: IR (neat) 2979, 1732, 1699, 1464, 1406, 1430, 1173 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 2.09-2.41 (m, 2H), 2.70-3.00 (m, 1H), 3.20-3.55 (m, 1H), 3.28 (dd, *J* = 15.9, 5.9 Hz, 2H), 3.68 (dd, *J* = 15.9, 5.9 Hz, 1H), 3.78-4.03 (m, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.00-5.14 (m, 4H), 5.64-5.84 (m, 2H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 298.2018, found: 298.2016.

**Ethyl 2-{{[3-buten-1-yl(*tert*-butoxycarbonyl)amino]methyl}-4-pentenoate (15).** This compound was prepared from **12** using a procedure similar to that employed for the preparation of **14** (57%): IR (neat) 2978, 2933, 1732, 1697, 1415, 916, 775 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 2.10-2.45 (m, 4H), 2.68-3.02 (m, 1H), 3.20-3.55 (m, 4H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.00-5.12 (m, 4H), 5.68-5.81 (m, 2H); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 312.2175, found: 312.2171.

**Ethyl 2-{{(*tert*-butoxycarbonyl)(4-penten-1-yl)amino]methyl}-4-pentenoate (16).** This compound was prepared from **13** using a procedure similar to that employed for the preparation of **14** (73%): IR (neat) 2977, 2933, 1734, 1699, 1415, 1365, 1173, 914 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.25 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.50-1.70 (m, 2H), 1.95-2.10 (m, 2H), 2.10-2.45 (m, 4H), 2.70-2.95 (m, 1H), 2.98-3.13 (m, 1H), 3.27 (dd, *J* = 14.0, 8.5 Hz, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.94-5.12 (m, 4H), 5.68-5.90 (m, 2H); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 326.2331, found: 326.2318.

**1-tert-Butyl 3-ethyl 2,3,4,7-tetrahydro-1H-azepine-1,3-dicarboxylate (17).** To a solution of **14** (297 mg, 1.00 mmol) in anhydrous CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 ml) was added 2nd generation Grubbs' catalyst **3** (85 mg, 0.10 mmol). The mixture was refluxed under N<sub>2</sub> atmosphere for 2 h. After cooling to room temperature, solvent was evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane (5:95) to give **17** (262 mg, 97%) as an oil: IR (neat) 2978, 2933, 1734, 1699, 1460, 1415, 1365, 1248, 1167, 1038 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.22-1.29 (m, 3H), 1.47 (s, 9H), 2.38-2.55 (m, 2H), 2.88-3.00 (m, 1H), 3.52 (dd, *J* = 13.9, 8.8 Hz, 1H), 3.72-4.05 (m, 3H), 4.05-4.28 (m, 3H), 5.60-5.80 (m, 2H); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub>Na (M+Na)<sup>+</sup>: 292.1525, found: 292.1532.

**1-tert-Butyl 3-ethyl 3,4,7,8-tetrahydro-1,3(2H)-azocinedicarboxylate (18).** This compound was prepared from **15** using a procedure similar to that employed for the preparation of **17** (98%): IR (neat) 2976, 2935, 1732, 1697, 1466, 1414, 1365, 1171, 931, 877, 729 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.20-1.32 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.95-2.22 (m, 2H), 2.22-2.45 (m, 2H), 2.60-2.83 (m, 1H), 2.83-3.00 (m, 2H), 3.40-3.60 (m, 1H), 3.78-3.90 (m, 1H), 4.08-4.25 (m, 2H), 5.45-5.92 (m, 2H); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>15</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 284.1862, found: 284.1849.

**1-tert-Butyl 3-ethyl 2,3,4,7,8,9-hexahydro-1H-azonine-1,3-dicarboxylate (19).** This compound was prepared from **16** using a procedure similar to that employed for the preparation of **17** as a 4:1 mixture of **19** and **18** (24%). Analytically pure **19** was purified by preparative TLC: IR (neat) 2970, 2925, 1732, 1701, 1483, 1169, 864 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, major rotomer) δ 1.24 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.47 (s, 9H), 1.95-2.17 (m, 2H), 2.18-2.48 (m, 2H), 2.57-2.75 (m, 2H), 2.80-2.87 (m, 1H), 3.39-3.46 (m, 1H), 3.56 (ddd, *J* = 13.9, 5.9, 2.2 Hz, 1H), 3.77 (dd, *J* = 13.5, 5.9 Hz, 1H), 4.14 (q, *J*

= 7.1 Hz, 2H), 5.42-5.62 (m, 2H); HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{16}H_{28}NO_4$  (M+H)<sup>+</sup>: 298.2018, found: 298.2028.

**Ethyl 2,3,4,7-tetrahydro-1H-azepine-3-carboxylate hydrochloride (20).** **17** (280 mg, 1.04 mmol) was dissolved in EtOAc (5 ml) and 4 N HCl in EtOAc (2.5 ml, 10 mmol) was added under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 3 h. The volatiles were evaporated, and the residue was dried under vacuum to give crude **20**. This material was used for the next step without further purification.

**Ethyl 1,2,3,4,7,8-hexahydro-3-azocinecarboxylate hydrochloride (21).** This compound was prepared from **18** using a procedure similar to that employed for the preparation of **20**. This material was used for the next step without further purification.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-(2-propenylamino)propionic acid (23).** To a solution of **11** (4.35 g, 76.2 mmol) in EtOH (75 ml) was added 1N aqueous NaOH solution (91 ml, 91 mmol). After stirring at room temperature overnight, EtOH was evaporated off, and residual aqueous phase was washed with IPE. The aqueous phase was acidified to pH 2.5 with 1N HCl solution, and extracted with EtOAc. The extract was dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo to give **23** (10.5 g, 73%) as a colorless oil: IR (neat) 2976, 2933, 2866, 1728, 1693, 1479, 1165, 926, 868, 775 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.46 (s, 9H), 2.63 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 3.48 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H), 3.85 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 2H), 5.08-5.17 (m, 2H), 5.77 (ddt,  $J$  = 17.6, 9.6, 5.6 Hz, 1H); MS (ESI)  $m/z$  230.15 (M+H)<sup>+</sup>.

***N*-(*tert*-Butoxycarbonyl)-3-(2-butenylamino)propionic acid (24).** This compound was prepared from **12** using a procedure similar to that employed for the preparation of **23** (95%): <sup>1</sup>H NMR



(CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.46 (s, 9H), 2.28 (dt,  $J = 7.0, 7.0$  Hz, 2H), 2.63 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.28 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.47 (t,  $J = 5.1$  Hz, 2H), 5.01-5.11 (m, 2H), 5.76 (ddt,  $J = 17.1, 10.1, 7.0$  Hz, 1H).

**(4R)-Benzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-3-(2-propenylamino)propionyl]-2-oxazolidinone (25).**

To a solution of **23** (6.88 g, 30.0 mmol) in THF (70 ml) was added Et<sub>3</sub>N (5.0 ml, 36.0 mmol) and pivaloyl chloride (4.10 ml, 33.0 mmol) at  $-70$  °C. After stirring at the same temperature for 30 min, THF (60 ml) solution of lithium (*R*)-4-benzyl-2-oxazolidinone (33.0 mmol), prepared from (*R*)-4-benzyl-2-oxazolidinone (5.85 g, 33.0 mmol) and *n*-BuLi (1.59 M in hexane, 20.8 ml, 33.0 mmol) at  $-70$  °C in advance, was added dropwise via syringe. After 30 min, the mixture was allowed to warm to  $0$  °C and stirred for further 30 min by adding a saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution and EtOAc. The organic layer separated was washed with water and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane (1: 3) to give **25** (9.60 g, 82%) as a colorless oil: IR (neat) 2978, 2931, 1782, 1736, 1699, 1456, 1049, 761, 704 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.45 (s, 9H), 2.76 (dd,  $J = 12.6, 10.0$  Hz, 1H), 3.20-3.25 (m, 2H), 3.31 (dd,  $J = 13.0, 3.0$  Hz, 1H), 3.45-3.70 (m, 2H), 3.75-4.00 (m, 2H), 4.10-4.26 (m, 2H), 4.55-4.75 (m, 2H), 5.05-5.25 (m, 2H), 5.80 (ddt,  $J = 15.8, 11.3, 5.6$  Hz, 1H), 7.19-7.39 (m, 5H); HRMS  $m/z$  calcd for C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 389.2063, found: 389.2067;  $[\alpha]_D^{26} -46.2^\circ$  ( $c$  1.03, CHCl<sub>3</sub>).

**(4R)-Benzyl-1-[N-(tert-butoxycarbonyl)-3-(3-butenylamino)propionyl]-2-oxazolidinone (26).**

This compound was prepared from **24** using a procedure similar to that employed for the preparation of **25** (83%): IR (neat) 2978, 2929, 1784, 1736, 1697, 1479, 1389, 1365, 1051, 997, 918, 704 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.46 (s, 9H), 2.25-2.39 (m, 1H), 2.68-2.88 (m, 1H), 3.10-3.42 (m, 5H), 3.48-3.68 (m, 2H), 4.10-4.28 (m, 2H), 4.56-4.75 (m, 1H), 5.02-5.10 (m, 2H), 5.78 (ddt,  $J =$

17.0, 9.7, 6.9 Hz, 1H), 7.20-7.36 (m, 5H); HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{22}H_{31}N_2O_5$  (M+H)<sup>+</sup>: 403.2253, found: 403.2232;  $[\alpha]_D^{28}$   $-44.2^\circ$  ( $c$ 1.04,  $CHCl_3$ ).

**(4R)-Benzyl-1-[N-(*tert*-butoxycarbonyl)-(2R)-(2-propenyl)-3-(2-propenylamino)propionyl]-2-oxazolidinone (27).** To a solution of **25** (777 mg, 2.0 mmol) in dry THF (10 ml) was added 1N solution of  $NaN(TMS)_2$  in THF (2.2 ml, 2.2 mmol) dropwise below  $-70^\circ C$ . After stirring at  $-78^\circ C$  for 30 min, allyl iodide (4.8 ml, 52.5 mmol) was added dropwise at  $-78^\circ C$ . The mixture was stirred at  $-78^\circ C$ , and allowed to warm to  $0^\circ C$  and stirred for 30 min at the same temperature, then quenched by phosphate buffer solution (pH = 7) and extracted with EtOAc. The extract was washed with water and brine, dried over  $Na_2SO_4$ , and evaporated in vacuo. The residue was purified by a medium-pressure silica gel column chromatography with a mixture of EtOAc/hexane (1:9) to give **27** (550 mg, 64%) as an amorphous solid: IR (KBr) 2978, 2931, 1782, 1697, 1616, 1392, 1367, 1165, 762, 702  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.46 (s, 9H), 2.20-2.35 (m, 1H), 2.35-2.62 (m, 1H), 2.67 (dd,  $J = 6.7, 5.0$  Hz, 1H), 3.29 (dd,  $J = 6.7, 1.4$  Hz, 1H), 3.32-3.50 (m, 2H), 3.60-4.08 (m, 2H), 4.08-4.45 (m, 3H), 4.63-4.66 (m, 1H), 5.06-5.14 (m, 4H), 5.73-5.86 (m, 2H), 7.21-7.35 (m, 5H); HRMS  $m/z$  calcd for  $C_{24}H_{33}N_2O_5$  (M+H)<sup>+</sup>: 429.2389, found: 429.2384;  $[\alpha]_D^{28}$   $-71.7^\circ$  ( $c$  1.11,  $CHCl_3$ ).

**(4R)-Benzyl-1-[N-(*tert*-butoxycarbonyl)-(2R)-(3-butenyl)-3-(2-propenylamino)propionyl]-2-oxazolidinone (28).** This compound was prepared from **26** using a procedure similar to that employed for the preparation of **27** (57%): IR (KBr) 2978, 2929, 1780, 1693, 1641, 1479, 1390, 1365, 1430, 1103, 918, 704  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.45 (s, 9H), 2.18-2.37 (m, 3H), 2.37-2.60 (m, 1H), 2.67 (dd,  $J = 6.6, 5.0$  Hz, 1H), 3.05-3.55 (m, 5H), 4.15-4.20 (m, 2H), 4.15-4.45 (m, 1H), 4.60-4.75 (m, 1H), 5.00-5.14 (m, 4H), 5.70-5.86 (m, 2H), 7.21-7.35 (m, 5H); HRMS  $m/z$  calcd for

$C_{25}H_{35}N_2O_5$  (M+H)<sup>+</sup>: 443.2546, found: 443.2546;  $[\alpha]_D^{28}$  -69.8° (c 0.67, CHCl<sub>3</sub>).

***tert*-Butyl (3*R*)-3-[(4*R*)-4-benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]carbonyl]-2,3,4,7-tetrahydro-1*H*-azepine-1-carboxylate (29).** This compound was prepared from **27** using a procedure similar to that employed for the preparation of **17** (97%): IR (KBr) 2976, 2929, 1772, 1697, 1641, 1684, 1456, 1365, 1051, 1020, 669 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, major rotomer) δ 1.47 (s, 9H), 2.38-2.58 (m, 2H), 2.73-2.79 (m, 1H), 3.28 (dd, *J* = 13.2, 3.3 Hz, 1H), 3.65 (dd, *J* = 13.9, 8.0 Hz, 1H), 3.79 (dd, *J* = 13.9, 6.8 Hz, 1H), 3.85-4.06 (m, 2H), 4.10-4.27 (m, 3H), 4.58-4.82 (m, 1H), 5.62-5.89 (m, 2H), 7.20-7.36 (m, 5H); HRMS *m/z* calcd for C<sub>22</sub>H<sub>29</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 401.2076, found: 401.2094;  $[\alpha]_D^{27}$  -42.0° (c 0.525, CHCl<sub>3</sub>).

***tert*-Butyl (3*R*)-3-[(4*R*)-4-benzyl-2-oxo-1,3-oxazolidin-3-yl]carbonyl]-1,2,3,4,7,8-hexahydro-3-azocine-1-carboxylate (30).** This compound was prepared from **28** using a procedure similar to that employed for the preparation of **17** (96%): IR (KBr) 2976, 2935, 1782, 1693, 1641, 1414, 1385, 1211, 1167, 762, 702 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, major rotomer) δ 1.47 (s, 9H), 2.05-2.24 (m, 2H), 2.25-2.42 (m, 2H), 2.43-2.58 (m, 1H), 2.74-2.81 (m, 1H), 3.24-3.35 (m, 2H), 3.35-3.57 (m, 1H), 3.62 (dd, *J* = 14.2, 4.8 Hz, 1H), 4.10 (ddd, *J* = 14.2, 7.0, 3.1 Hz, 1H), 4.39 (dt, *J* = 15.7, 4.8 Hz, 1H), 4.72 (ddd, *J* = 13.5, 7.1, 3.6 Hz, 1H), 5.55-5.62 (m, 1H), 5.96 (dt, *J* = 9.7, 8.2 Hz, 1H), 7.21-7.37 (m, 5H); HRMS *m/z* calcd for C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 415.2237, found: 415.2247;  $[\alpha]_D^{27}$  -100.4° (c 0.705, CHCl<sub>3</sub>).

**(*R*)-*N*-*tert*-Butoxycarbonyl-2,3,4,7-tetrahydro-1*H*-azepine-3-carboxylic acid (31).** Into a solution of **29** (560 mg, 1.40 mmol) in THF (28 ml) and H<sub>2</sub>O (9 ml) was added 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.27 ml, 11.2 mmol, 8.0 equiv) and 1 N aqueous LiOH solution (2.8 ml, 2.8 mmol, 2.0 equiv) under ice

cooling. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 30 min, then treated with 20% aqueous Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution (55 ml) and stirred for further 5 min. It was extracted with mixed solvent of THF-Et<sub>2</sub>O. The aqueous phase was acidified to pH~2 with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub>, and extracted with EtOAc twice. The extracts were combined and dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated in vacuo. The residue was purified by short column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/EtOAc (1/1) to give **31** as a solid (295 mg, 87%): IR (neat) 2978, 2933, 2866, 1734, 1697, 1419, 1367, 1269, 1252, 1167, 891 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.47 (s, 9H), 2.43-2.47 (m, 2H), 2.80-3.15 (m, 1H), 3.55-4.30 (m, 4H), 5.55-5.85 (m, 2H); HRMS *m/z* calcd for C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 242.1392, found: 242.1387; [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> -23.2° (*c* 1.01, CHCl<sub>3</sub>).

**(R)-N-tert-Butoxycarbonyl-1,2,3,4,7,8-hexahydroazocine-3-carboxylic acid (32).** This compound was prepared from **30** using a procedure similar to that employed for the preparation of **31** (93%): IR (neat) 2976, 2937, 2866, 1732, 1714, 1473, 1697, 1473, 1417, 1367, 1165, 930, 719 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.47 (s, 9H), 2.43-2.47 (m, 2H), 2.80-3.15 (m, 1H), 3.55-4.30 (m, 4H), 5.55-5.85 (m, 2H); HRMS *m/z* calcd for C<sub>13</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 256.1549, found: 256.1544; [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> -104° (*c* 1.01, CHCl<sub>3</sub>).

**Methyl (R)-2-(N-allylaminomethyl)-4-pentenoate (33).**<sup>32, 33</sup> Into a solution of **25** (530 mg, 1.24 mmol, 87% de) in THF (26.5 ml) and H<sub>2</sub>O (8.7 ml) was added 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.12 ml, 9.90 mmol, 8.0 equiv) and 1 N aqueous LiOH solution (2.48 ml, 2.48 mmol, 2.0 equiv) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at the same temperature for 1.5 h, then treated with 20% aqueous Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution (55 ml) and stirred for further 5 min. It was extracted with Et<sub>2</sub>O. The aqueous phase was acidified to pH~2 with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub>, and extracted with EtOAc. The extracts were dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated in vacuo. The residue was dissolved with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

(9 ml) and MeOH (3 ml) and to this was added trimethylsilyldiazomethane in hexane (2.0 M in hexane, 0.75 ml, 1.5 mmol) and the mixture was stirred at room temperature for 30 min. After the additions of small amount of acetic acid to quench the excess trimethylsilyldiazomethane, volatiles were evaporated. The residue was added CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 ml) and TFA (1 ml), and it was stirred for 20 min. To the resulting solution was added with EtOAc, and washed with water three times. The combined aqueous phase was adjusted to pH~9 with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, and extracted with EtOAc twice. The extracts were dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated in vacuo to give **33** (72 mg, 32%) as an oil. This materials was immediately used to the next steps without further purification: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.26-2.34 (m, 1H), 2.34-2.45 (m, 1H), 2.68-2.76 (m, 1H), 2.88-2.94 (m, 1H), 3.70 (s, 3H), 5.03-5.11 (m, 2H), 5.13 (ddd, *J* = 10.2, 2.9, 1.1 Hz, 1H), 5.20 (ddd, *J* = 12.2, 3.3, 1.4 Hz, 1H), 5.74 (ddt, *J* = 17.0, 10.2, 7.0 Hz, 1H), 5.87 (ddd, *J* = 17.2, 10.2, 6.0 Hz, 1H).

**Methyl (*R*)-2-(*N*-*tert*-butoxycarbonyl-aminomethyl)-4-pentenoate (**34**).**<sup>34)</sup> To a solution of **33** (72 mg, 0.39 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.4 ml) were added *N*, *N'*-dimethylbarbituric acid (123 mg, 0.78 mmol) and Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (14 mg, 0.012 mmol) under N<sub>2</sub> atmosphere. The solution was stirred at room temperature for 2.5 h. After adjusting the solution to pH = 9 by adding THF (5 ml) and saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, (Boc)<sub>2</sub>O (100 mg, 0.47 mmol) was added. The solution was further stirred at room temperature overnight. To the resulting mixture was added water and extracted with EtOAc. The organic phase was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with hexane/EtOAc (7/1) to give **34** (60 mg, 63%) as an oil: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.43 (s, 9H), 2.24-2.36 (m, 1H), 2.37-2.43 (m, 1H), 2.66-2.76 (m, 1H), 3.21-3.28 (m, 1H), 3.34-3.44 (m, 1H),

4.80-4.95 (br, 1H), 5.05-5.13 (m, 2H), 5.75 (ddt,  $J = 17.2, 9.9, 7.0$  Hz, 1H).

**(R)-2-(N-tert-Butoxycarbonyl-aminomethyl)-4-pentenoic acid (35).** To a solution of **34** (58 mg, 0.24 mmol) in THF (0.6 ml) and MeOH (0.6 ml) was added 1N aqueous LiOH solution (0.50 ml, 0.50 mmol). After stirring overnight at room temperature, to this was added water and washed with Et<sub>2</sub>O. The aqueous phase was acidified to pH 2.5 with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, and extracted with Et<sub>2</sub>O. The extract was dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo to give **35** (45 mg, 82%) as a colorless oil: IR (neat) 2976, 2931, 2870, 1732, 1697, 1481, 1419, 1367, 1167, 1155, 773 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>) δ 1.41 (s, 9H), 2.26-2.41 (m, 2H), 2.68 (quintet,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 3.26-3.41 (m, 2H), 5.01 (dt,  $J = 10.1, 1.1$  Hz, 1H), 5.11 (ddd,  $J = 17.0, 3.4, 1.5$  Hz, 1H), 5.90-6.10 (br, 1H);  $[\alpha]_D^{26} +11.0^\circ$  (*c* 1.09, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

**Ethyl (2E)-3-(4-pyridinyl)acrylate (37).** To a suspension of NaH (60% dispersion in mineral oil, 39.4 g, 1.02 mol) in THF (500 ml) was added dropwise triethyl phosphonoacetate (230 g, 1.02 mol) in THF (500 ml) over a period of 0.5 h at 15-20 °C. The mixture was stirred for 1 h at the same temperature. To the reaction mixture was added isonicotinaldehyde (**3**) (100 g, 934 mmol) in THF (40 ml) over a period of 20 min at room temperature, and the mixture was stirred overnight at the same temperature. The resulting mixture was poured into 1 N HCl and extracted with EtOAc twice. The combined organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residual solid was triturated with hexane, filtered, washed with hexane, dried in vacuo to give **37** (129 g, 78%) as a solid: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 4.23 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 6.90 (d,  $J = 16.4$  Hz, 1H), 7.64 (d,  $J = 16.4$  Hz, 1H), 7.69 (dd,  $J = 7.7, 4.5$  Hz, 2H), 8.64 (dd,  $J = 7.7, 4.5$  Hz, 2H); MS (APCI) *m/z* 178 (M+H)<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-(3-ethoxy-3-oxopropyl)-1-piperidinecarboxylate (38).** A solution of **37** (123 g, 747 mmol) in EtOH (1500 ml) and 4 N HCl in 1,4-dioxane (187 ml, 748 mmol) was treated with PtO<sub>2</sub> (12.3 g) with bubbling H<sub>2</sub> for 5 h at 45 °C. After the catalyst was filtered off, the filtrate was concentrated in vacuo. The residual solid was triturated with Et<sub>2</sub>O, filtered, washed with Et<sub>2</sub>O, dried in vacuo to give ethyl 3-(4-piperidinyl)propanoate hydrochloride (146 g, 88%) as a solid: <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.18 (t, *J* = 7.1Hz, 3H), 1.20-1.60 (m, 5H), 1.65-1.85 (m, 2H), 2.31 (t, *J* = 7.3Hz, 2H), 2.68-2.85 (m, 2H), 3.16-3.22 (m, 2H), 4.05 (q, *J* = 7.1Hz, 2H), 8.85-9.55 (br, 2H); MS (APCI) *m/z* 186 (M+H)<sup>+</sup>. To a suspension of this material (50 g, 225 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (500 ml) were added Et<sub>3</sub>N (69 ml, 496 mmol) and (Boc)<sub>2</sub>O (59 g, 271 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (200 ml) under ice cooling. The mixture was stirred for 5 h at room temperature. To this was added water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, water, and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100:1). The eluate was concentrated in vacuo to give **38** (52 g, 81%) as an oil: IR (KBr) 2980, 2960, 2920, 1730, 1690, 1160 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.01-1.19 (m, 2H), 1.26 (t, *J* = 7.1Hz, 3H), 1.39 (s, 9H), 1.41-1.72 (m, 5H), 2.32 (t, *J* = 7.6Hz, 2H), 2.61-2.72 (m, 2H), 4.04-4.18 (m, 2H), 4.13 (q, *J* = 7.1Hz, 2H); MS (APCI) *m/z* 186 (M+H-Boc)<sup>+</sup>.

**3-[1-(tert-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoic acid (39).** To a solution of **38** (46.9 g, 164 mmol) in THF (200 ml) and EtOH (200 ml) was added dropwise 1 N aqueous NaOH solution (247 ml, 247 mmol) and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. Volatiles were evaporated off, and residual aqueous solution was adjusted to pH 4 with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was triturated with the mixture of

Et<sub>2</sub>O and hexane, collected and dried in vacuo to give **39** (38.5 g, 91%) as a solid: IR (nujol) 1730, 1660, 1260, 1160 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.84-1.07 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.41-1.50 (m, 3H), 1.55-1.65 (m, 2H), 2.22 (t, *J* = 7.4Hz, 2H), 2.50-2.80 (m, 2H), 3.88-3.95 (m, 2H), 12.03 (s, 1H); MS (APCI) *m/z* 158 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl 3-[(3-pyrrolidinylcarbonyl)amino]propanoate hydrochloride (41).** To a solution of **40** (431 mg, 2.0 mmol), β-alanine methyl ester hydrochloride (307 mg, 2.2 mmol) and HOBT (324 mg, 2.4 mmol) in DMF (4.3 ml) were added EDC·HCl (460 mg, 2.4 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.34 ml, 2.4 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. To the resulting solution was added saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water (x 3) and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100:1). The eluate was concentrated in vacuo to give an intermediate oil (471 mg, 79%): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.45 (s, 9H), 2.00-2.20 (m, 2H), 2.55 (t, *J* = 5.9Hz, 2H), 2.72-2.90 (m, 1H), 3.24-3.68 (m, 6H), 3.71 (s, 3H), 6.12-6.30 (br, 1H). This intermediate (450 mg, 1.50 mmol) was dissolved in EtOAc (4.5 ml), and to this was added 4 N HCl in EtOAc (3.75 ml, 15.0 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The volatiles were evaporated, and the residue was dried under vacuum to give **41** (350 mg, 99%) as an oil. **41** was used for the next step without further purification.

**3-[(1-[3-(4-Piperidiny)propanoyl]-3-pyrrolidinyl)carbonyl]amino]propanoic acid (1a).** To solutions of **39** (210 mg, 0.81 mmol), **41** (231 mg, 0.98 mmol) and HOBT (165 mg, 1.22 mol) in DMF (4 ml) was added EDC·HCl (234 mg, 1.22 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.34 ml, 2.4 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. To the resulting



solution was added saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100:1). The eluate was concentrated in vacuo to give the desired intermediate as a viscous oil (193 mg, 54%): IR (KBr) 2966, 2939, 1734, 1684, 1653, 1618, 1456, 1269 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.98-1.22 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.52-1.78 (m, 5H), 2.02-2.40 (m, 4H), 2.48-3.02 (m, 5H), 3.30-3.88 (m, 6H), 3.71 (s, 3H), 3.98-4.16 (m, 2H), 6.20- 6.38 (m, 1H); MS (ESI) *m/z* 440.4 (M+H)<sup>+</sup>. To a solution of this material (185 mg, 0.42 mmol) in THF (1.8 ml) and EtOH (1.8 ml) was added aqueous 1 N LiOH (1.47 ml, 1.47 mmol) solution under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The resulting solution was washed with Et<sub>2</sub>O and the pH of the aqueous layer was adjusted to 3 with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to give crude carboxylic acid as a colorless oil. To a solution of this carboxylic acid in EtOAc (1 ml) was added 4 N HCl in EtOAc (1.05 ml, 4.2 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting precipitate was collected and dissolved in water. The pH of the solution was adjusted to 7 with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution. The solution was then subjected into ODS column chromatography. The eluate was concentrated in vacuo and lyophilized to give **1a** as an amorphous solid (124 mg, 91%): IR (KBr) 1670, 1653, 1616, 1454, 1201, 1134 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.30-1.48 (m, 2H), 1.52-1.70 (m, 3H), 1.96 (d, *J* = 13.7 Hz, 2H), 1.96-2.32 (m, 2H), 2.32-2.50 (m, 4H), 2.97 (dt, *J* = 2.6, 12.8 Hz, 2H), 3.05-3.20 (m, 1H), 3.33-3.47 (m, 4H), 3.47-3.81 (m, 4H); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 326.2080, found: 326.2082.

**Ethyl *N*-{3-[1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propionyl}-3-piperidinecarboxylic acid (44).**

To a solution of **39** (2.32 g, 9.0 mmol), ethyl 3-piperidinecarboxylate (**43**) (1.41 g, 9.0 mmol) and HOBT (1.22 g, 9.0 mmol) in DMF (23 ml) was added EDC (1.73 g, 9.0 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. To the resulting solution was added saturated NaHCO<sub>3</sub> followed by extraction with EtOAc. The organic layer was washed with water (x 3) and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with acetone/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1). The eluate was concentrated in vacuo to give **44** (2.63 g, 74%) as a viscous oil: IR (KBr) 1684, 1653, 1558, 1469, 1458, 1201 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, rotomer observed) δ 0.80-1.10 (m, 2H), 1.18 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.38 (s, 9H), 1.40-1.78 (m, 7H), 1.78-2.02 (m, 1H), 2.22-2.45 (m, 3H), 2.50-2.93 (m, 3H), 2.96-3.15 (m, 1H), 3.64-3.85 (m, 2H), 3.85-4.01 (m, 2+1/2H), 4.01-4.12 (m, 2H), 4.26-4.40 (m, 1/2H); MS (ESI) *m/z* 419.4 (M+Na)<sup>+</sup>.

**Ethyl *N*-{3- [1 - (*tert*-butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propionyl}-1*H*-2,5,6,7-tetrahydroazepine-3-carboxylate (**45**)**. This compound was prepared from **39** and **17** using a procedure similar to that employed for the preparation of **44** (68%): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.07-1.13 (m, 2H), 1.22-1.32 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.53-1.70 (m, 6H), 2.32-2.49 (m, 4H), 2.60-2.72 (m, 2H), 2.82-3.06 (m, 1H), 3.66-4.20 (m, 7H), 5.63-5.83 (m, 2H); MS (APCI) *m/z* 309 (M-Boc+H)<sup>+</sup>.

**Ethyl *N*-{3- [1 - (*tert*-butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propionyl}-3,4,7,8-tetrahydro-1-(2*H*)-azocine-3-carboxylate (**46**)**. This compound was prepared from **39** and **18** using a procedure similar to that employed for the preparation of **44** (86%): This material was used for the next step without further purification.

**3-[(1-[3-(4-Piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl)carbonyl]amino]propanoic acid (**1b**)**. To a

solution of **44** (2.58 g, 6.48 mmol) in THF (26 ml) and EtOH (26 ml) was added dropwise 3.0 M aqueous NaOH solution (6.48 ml, 19.4 mmol) under ice cooling and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The resulting solution was adjusted to pH 3 with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was triturated with hexane, collected, and dried in vacuo to give carboxylic acid intermediate (2.31 g, 97%) as an amorphous solid: IR (KBr) 2931, 2862, 1732, 1716, 1697, 1686, 1456, 1279, 1248, cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, rotomer observed) δ 0.82-1.12 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.38-1.79 (m, 8H), 1.80-2.02 (m, 1H), 2.13-2.48 (m, 3H), 2.50-2.80 (m, 3H), 2.88-3.08 (m, 1H), 3.64-4.01 (m, 3+1/2H), 4.30-4.44 (m, 1/2H), 11.75-12.82 (br, 1H); MS (ESI) *m/z* 391.3 (M+Na)<sup>+</sup>. To a solution of this material (2.21 g, 6.0 mmol), β-alanine methyl ester hydrochloride (837 mg, 6.0 mmol) and HOBT (811 mg, 6.0 mmol) in DMF (22 ml) were added EDC·HCl (1.15 g, 6.0 mmol) and Et<sub>3</sub>N (0.86 ml, 6.0 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight. To the resulting solution was added saturated NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/acetone (3:1). The eluate was concentrated in vacuo to give the desired intermediate as an oil (2.07 g, 76%): IR (neat) 2933, 2861, 1734, 1697, 1684, 1653, 1541, 1363, 1167, 970, 860 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.82-1.12 (m, 2H), 1.15-1.80 (m, 9H), 1.38 (s, 9H), 2.02-2.38 (m, 3H), 2.38-2.78 (m, 5H), 2.82-3.18 (m, 1H), 3.18-3.41 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 3.66-4.02 (m, 3H), 4.10-4.42 (m, 1H), 7.92-8.08 (m, 1H); MS (ESI) *m/z* 476.4 (M+Na)<sup>+</sup>. To a solution of this material (2.03 g, 4.48 mmol) in THF (5 ml) and MeOH (10 ml) was added LiOH (56 mg, 13.4 mmol) solution in H<sub>2</sub>O (10 ml) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 1 h. The resulting solution was washed with Et<sub>2</sub>O. The pH of the aqueous layer was adjusted to 3 with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution,

and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to give the carboxylic acid intermediate (1.62 g, 82%) as an oil: IR (neat) 1720, 1610, 1430, 1160 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.84-1.09 (m, 2H), 1.32-1.83 (m, 9H), 1.38 (s, 9H), 2.26-2.40 (m, 5H), 2.55-2.75 (m, 3H), 2.84-3.27 (m, 4H), 3.71-3.98 (m, 3H), 4.11-4.38 (m, 1H), 7.90-8.02 (m, 1H); MS (APCI) *m/z* 440 (M+H)<sup>+</sup>. To a solution of this carboxylic acid (1.58 g, 3.59 mmol) in EtOAc (16 ml) was added 4 N HCl in EtOAc (13.5 ml, 54.0 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting precipitate was collected, washed with Et<sub>2</sub>O, and dried under vacuum to give **1b** as a white solid (1.27 g, 94%): IR (KBr) 1687, 1684, 1647, 1456, 1201, 1132 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.21-1.65 (m, 7H), 1.62-1.83 (m, 3H), 2.29-2.41 (m, 4H), 2.56-3.07 (m, 4H), 3.15-3.30 (m, 4H), 3.70-3.85 (m, 1H), 4.13-4.38 (m, 4H), 7.97-8.14 (m, 1H), 8.65-9.00 (br, 1H), 9.00-9.25 (br, 1H); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 340.2236, found: 340.2226.

**3-[(1-[3-(4-Piperidinyl)propanoyl]-2,3,4,7-tetrahydro-1H-azepin-3-yl)carbonyl]amino]propanoic acid (1d).** This compound was prepared from **45** using a procedure similar to that employed for the preparation of **1b** (53%): IR (KBr) 1630, 1568, 1466, 1402 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.36-1.61 (m, 5H), 1.94-2.01 (m, 2H), 2.36-2.54 (m, 6H), 2.91-3.04 (m, 3H), 3.37-3.47 (m, 4H), 3.79-3.88 (m, 2H), 4.02-4.23 (m, 2H), 5.64-5.70 (m, 1H), 5.72-5.93 (m, 2H); HRMS (ESI) *m/z* calcd for C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 352.2236, found: 352.2231.

**3-[(1-[3-(4-Piperidinyl)propanoyl]-1,2,3,4,7,8-hexahydro-3-azocinyl)carbonyl]amino]propanoic acid (1f).** This compound was prepared from **46** using a procedure similar to that employed for the preparation of **1b** (68%): IR (KBr) 1653, 1645, 1558, 1387, 1238, 1213 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.36-1.62 (m, 5H), 1.93-2.01 (m, 2H), 2.24-2.46 (m, 8H), 2.92-3.46 (m, 9H), 3.79-4.23 (m,

2H), 5.71-5.90 (m, 2H); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{19}H_{32}N_3O_4$  (M+H)<sup>+</sup>: 366.2393, found: 366.2382.

**3-[(1-[3-(4-Piperidiny)propanoyl]hexahydro-1H-azepin-3-yl)carbonyl]amino]propanoic acid**

**(1c).** A mixture of **1d** (70 mg, 0.20 mmol) and PtO<sub>2</sub> (10 mg) in MeOH (5 ml) was hydrogenated under H<sub>2</sub> atmosphere (1 atm) at room temperature for 8 h. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate was evaporated in vacuo. The residue was purified by Daisogel SP-1200<sup>®</sup> (Daiso) reversed phase chromatography eluting with a mixture of CH<sub>3</sub>CN/water (1:10). The fractions containing a product were concentrated in vacuo and lyophilized to give **1c** (61 mg, 86%) as a white powder: IR (KBr) 1635, 1624, 1541, 1466, 1398 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.37-2.01 (m, 13H), 2.36-2.64 (m, 5H), 2.93-3.05 (m, 2H), 3.21-3.94 (m, 8H); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{18}H_{32}N_3O_4$  (M+H)<sup>+</sup>: 354.2393, found: 354.2396.

**3-[(1-[3-(4-piperidiny)propanoyl]octahydro-3-azociny)carbonyl]amino]propanoic acid (1e).**

This compound was prepared from **1f** using a procedure similar to that employed for the preparation of **1c** (89%): IR (KBr) 1645, 1635, 1626, 1558, 1456, 1396 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.38-2.05 (m, 15H), 2.36-2.50 (m, 4H), 2.92-3.05 (m, 3H), 3.29-3.47 (m, 6H), 3.71-3.83 (m, 2H); HRMS (ESI)  $m/z$  calcd for  $C_{16}H_{34}N_3O_4$  (M+H)<sup>+</sup>: 368.2549, found: 368.2554.

**Ethyl (R)-piperidine-3-carboxylate (47).** To a solution of ethyl piperidine-3-carboxylate (**43**) (1000 g, 6.36 mmol) in EtOH (25 L) was added L-tartaric acid (954 g, 6.36 mol) and the resulting solution was stored at room temperature overnight. The resulting precipitate was collected on a Büchner funnel and washed with EtOH, and dried. The crude crystal was recrystallized from EtOH for three times. The resulting crystal was treated with saturated K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and

extracted with EtOAc (x 3). The combined organic phase was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated in vacuo. The residual oil was distilled under the reduced pressure to give enantiomerically pure **47** (200 g, 20% recovery): bp 63 °C/3 mmHg; IR (nujol) 1710, 1620, 1450 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.30-1.80 (m, 3H), 1.90-2.04 (m, 1H), 2.38-2.48 (m, 1H), 2.58-2.70 (m, 1H), 2.81 (dd, *J* = 12.4, 9.2 Hz, 1H), 2.89-2.97 (m, 1H), 3.17 (dd, *J* = 12.4, 3.7 Hz, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H).

**(R)-1-[3-(1-*tert*-Butoxycarbonyl-4-piperidyl)propionyl]-3-piperidinecarboxylic acid (49).** To a solution of **39** (3.04 g, 11.8 mmol), **47** (1.86 g, 11.8 mmol) and HOBT (1.60 g, 11.8 mmol) in DMF (20 ml) was added EDC (2.16 ml, 11.8 mmol) under stirring at 0 °C. After stirring at ambient temperature overnight, the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The extract was washed with water, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo. The residue was purified by chromatography on silica gel with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100:1) to give the intermediate (4.01 g, 86%) as an oil: IR (neat) 2960, 2900, 2840, 1710, 1665, 1630 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, rotamer observed) δ 1.00-1.20 (m, 1H), 1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.48-1.88 (m, 9H), 1.98-2.15 (m, 1H), 2.31-2.51 (m, 3H), 2.62-3.12 (m, 4H), 3.35-3.47 (m, 1/2H), 3.65-3.85 (m, 1H), 4.00-4.22 (m, 4H), 4.56-4.69 (m, 1/2H); MS (APCI) *m/z* 397 (M+H)<sup>+</sup>. A solution of this intermediate (3.99 g, 10.1 mmol) in a mixture of EtOH (10 ml), THF (10 ml), and water (10 ml) was added LiOH (1.27 g, 30.2 mmol) under stirring at 0 °C. After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was acidified with aqueous 5% KHSO<sub>4</sub> solution and extracted with EtOAc. The extract was washed with water, and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo to give **49** (3.34 g, 90%) as a white solid: mp 102-104°C; IR (nujol) 1720, 1680, 1630 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.84-1.10 (m, 2H), 1.38-1.76 (m, 8H), 1.38 (s, 9H), 1.82-2.01 (m, 1H), 2.20-2.45 (m, 3H), 2.59-2.76 (m, 2H), 2.89-3.09 (m, 1H), 3.28-3.40 (m, 1H), 3.69-3.98 and 4.31-4.44 (total 4H,

m); MS (APCI)  $m/z$  269 (M-Boc+H)<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 61.93; H, 8.75; N, 7.60. Found: C, 62.04; H, 8.94; N, 7.64;  $[\alpha]_D^{26}$  -33.9° (*c* 1.00, MeOH).

**(R)-3-[(1-[3-(4-Piperidiny)propanoyl]-3-piperidiny)carbonyl]amino]propanoic acid (50).**

This compound was prepared from **49** and β-alanine ethyl ester using a procedure similar to that employed for the preparation of **1b** (89%) as hydrochloride salt: IR (nujol) 2920, 1715 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.21-1.65 (m, 7H), 1.62-1.83 (m, 3H), 2.29-2.41 (m, 4H), 2.56-3.07 (m, 4H), 3.15-3.26 (m, 4H), 3.70-3.85 (m, 1H), 4.13-4.37 (m, 4H), 7.97-8.10 (m, 1H), 8.60-8.76 (br, 1H), 8.91- 9.03 (br, 1H); MS (APCI)  $m/z$  340 (M+H)<sup>+</sup>; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 340.2236, found: 340.2227;  $[\alpha]_D^{25}$  -24.3° (*c* 1.00, MeOH).

**1.8.3. Platelet aggregation study<sup>36)</sup>**

Platelet aggregation assays were performed using NBS HEMA TRACER 801, an 8 channel aggregometer (Nikobioscience, Tokyo, Japan). Light transmittance of platelet poor plasma (PPP) was calibrated as 100%. Platelet rich plasma (PRP) was incubated for 2 min in the aggregometer at 37°C. ADP (2.5 μM for humans and 20 - 40 μM for dogs) was added as an agonist at which the full response of platelet aggregation was obtained, and the change in light transmittance was monitored with a PL500 recorder (Yokogawa, Japan). Percent inhibition of aggregation in the drug-treated sample was calculated by comparison with the aggregation in absence of drug or in the pretreatment period.

## 第2章 安全性の高い血小板凝集抑制注射剤の創出

### 2. 1. 安全性の高い血小板凝集抑制注射剤の創出の意義

序論で述べた様に、既存の血小板凝集抑制剤の多くは血小板凝集を抑制、すなわち血栓形成を抑える主作用と血管壁修復機能を抑制、すなわち出血が止まりにくくなるといった副作用を兼ね備えたまさに諸刃の剣の薬剤である。外的障害による出血以外にも血管内皮細胞中では、常に血小板による血管内皮細胞の修復が行われているが、この機能が血小板凝集抑制剤により阻止されれば、血管から内出血が起き、例えば脳出血といった致命的な副作用を併発する恐れがある。こういった理由により、これまでの抗血栓剤の使用は非常に慎重にならざるを得なかった。また GPIIb/IIIa を拮抗する作用機作を有する先行開発化合物の臨床実験からも同様の問題が浮上している<sup>39)</sup>。

私は、この血小板凝集抑制剤に付随する問題を払拭した薬剤を創出すべく以下の仮説を立

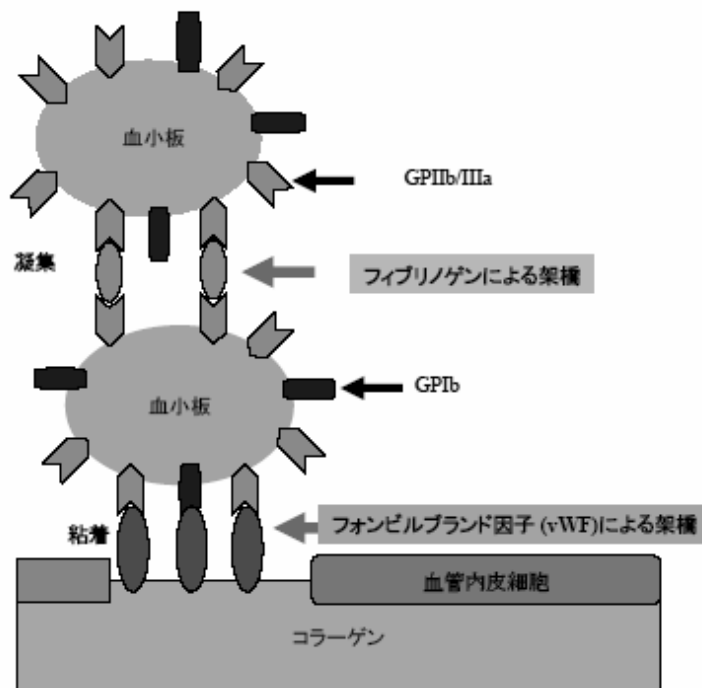


Figure 13. The differences the mechanism between the platelet aggregation and the platelet adhesion (血小板凝集と血小板血管壁粘着のメカニズムの違い)

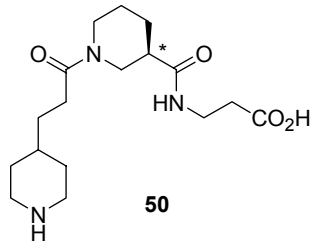
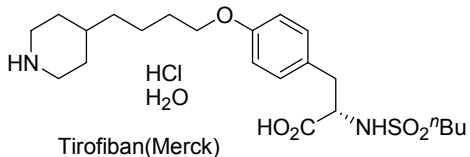


て、出血作用の少ない血小板凝集抑制注射剤創出研究を開始した。血小板の凝集、すなわち、血栓形成と血小板の血管内皮細胞への粘着メカニズムについて Figure 13 に示す。二次凝集と呼ばれる血小板同士の凝集、すなわち血栓形成は第 1 章で述べたように、血漿中蛋白のフィブリノゲンを介し、血小板同士が凝集するメカニズムによって起こる (Figure 6)。それに対し、一次凝集と呼ばれる血小板の血管壁への粘着は次のようにして起こる。すなわち、血管内皮細胞が損傷を受けると、その内部にあったコラーゲン部分が露出し、それにより血小板が活性化され、血管壁への粘着が起こる。この際、血小板は、凝集の際に介したフィブリノゲンとは別の血漿蛋白であるフォンビルブランド因子 (vonWillBrand Factor, 以下 vWF) を介した粘着であるということが解明されている<sup>40)</sup>。著者は、この血小板同士の凝集と血管壁への粘着は、その仲介する蛋白に違いがあるということに注目し、血小板のフィブリノゲン凝集のみを阻害し、vWF 粘着を阻害しなければ出血が起こりにくい安全性の高い薬剤の創出が達成できるのではないかと考えた。次節でこの凝集抑制と粘着抑制評価法について解説する。

## 2. 2. 主作用と副作用を示す評価法の定義とプロトタイプ化合物の評価

薬剤の主作用である血小板同士の凝集抑制作用 ( $IC_{50}$ )は、前章で述べたのと同じ方法で測定できる。この  $IC_{50}$  値を本章では  $IC_{50A}$  とする。それに対し、血小板の血管壁への粘着阻害作用の評価法は GPIIb/IIIa と vWF との結合を 50% 阻止する時の薬剤濃度 ( $IC_{50}$ )で測定できる。本章ではこの  $IC_{50}$  値を  $IC_{50B}$  とする。 $IC_{50A}$  値は数値が小さいほど薬剤の主作用が高いことを示す。それに対し、 $IC_{50B}$  値が大きいほど粘着抑制活性が低く、副作用が起こりにくいことを意味する。すなわち、主作用発現濃度と副作用発現濃度の比  $IC_{50B}/IC_{50A}$  が大きい値であれば、主作用と副作用の乖離度が高い、安全性の高い薬剤である指標となる。著者は、安全性の高い血小板凝集抑制剤の創出を行うにあたり、主作用の活性を示す  $IC_{50A}$  値と副作用の乖離度を示す  $IC_{50B}/IC_{50A}$ 、これら両方の値を注視しながら創出研究を進めた。まず、プロトタイプ化合物 **50** の安全性プロファイルを検証した。結果を Table 5 に示す。比較対照のため、メルク社が開発上市した同じ作用メカニズムを持つ Tirofiban<sup>22)</sup>も同じアッセ

**Table 5.** the verification of safety margin for the prototype **50**  
(プロトタイプ化合物**50**の安全域の検証)

	IC <sub>50</sub> (ADPinduced aggregation), nM <sup>a</sup> (IC <sub>50A</sub> )	IC <sub>50</sub> (inhibition of vWF mediated adhesion),nM <sup>b</sup> (IC <sub>50B</sub> )	ratio (IC <sub>50B</sub> )/(IC <sub>50A</sub> )
 <p><b>50</b></p>	241	335	1.39
 <p>Tirofiban(Merck)</p>	46 HCl H <sub>2</sub> O	6.7	0.15

<sup>a</sup> Concentration required to reduce binding ADP-induced human platelet aggregation response by 50%

<sup>b</sup> Concentration required to inhibit vWF mediated human platelet adhesion by 50%.

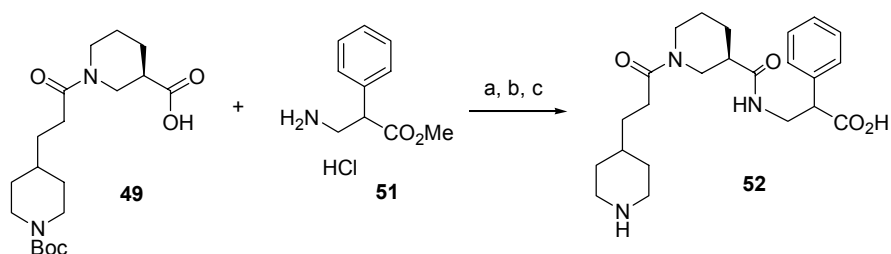
イに処した。その結果、**50**の主作用である血小板凝集抑制作用 IC<sub>50A</sub> 値は 241 nM と対照剤 Tirofiban の 5 倍以下の活性を示すに過ぎなかった。しかしながら、vWF との結合阻害濃度作用発現濃度 IC<sub>50B</sub> 値が 335 nM と Tirofiban の 50 倍も弱い値を示した。その結果、**50**の主作用/副作用発現濃度の比 IC<sub>50B</sub>/IC<sub>50A</sub> 値は 1.39 と、Tirofiban と比べ 10 倍近く高く、十分安全性の高い薬剤と十分なり得る要素を持つプロトタイプ化合物であることが判明した。そこで、著者は主作用 IC<sub>50A</sub> 値を向上させつつ IC<sub>50B</sub>/IC<sub>50A</sub> を更に向上させれば、先行化合物とは明らかに差別化できる安全性の高い薬剤を創出できることを確信し、プロトタイプ化合物 **50** を基にプロトタイプ最適化研究を行った。

### 2. 3. 血小板凝集抑制作用の向上のための分子設計

フィブリノゲン RGD 配列の N 末端側に続くアミノ酸 (L-セリンまたは L-フェニルアラニン) とのアミド結合部位に相当する部分をプロトタイプ化合物 **50** に当てはめて考えると、カルボン酸 α 位にアミド置換基を導入した場合に一致する。また Tirofiban 創出研究をはじめ

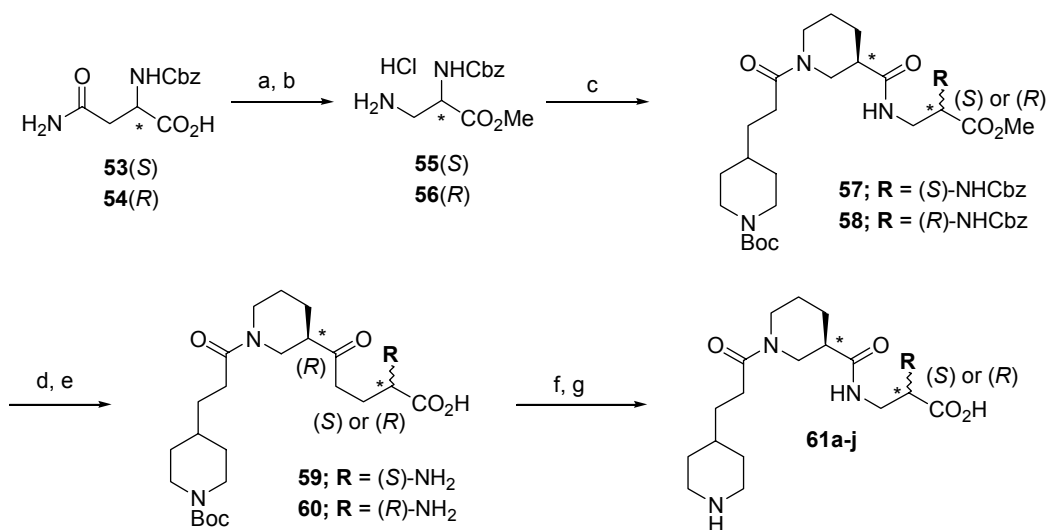
めとするこれまでの研究報告例<sup>21, 22)</sup>から、カルボン酸  $\alpha$  位を修飾する事により、その薬理活性を向上できると推測された。従って、プロトタイプ化合物 **50** のカルボン酸  $\alpha$  位にアミド置換基を導入すれば、GPIIb/IIIa 側との親和性が向上し、活性の向上が図れるのではないかと考え、プロトタイプ化合物 **50** のカルボン酸  $\alpha$  位にアミド基を始めとする種々の置換基導入を試みた。

#### 2. 4. プロトタイプ化合物からの変換



**Scheme 9.** Reagents and conditions: (a) EDC, HOBT, Et<sub>3</sub>N, DMF, ; (b) 1 N LiOH; (c) HCl, EtOAc, 100% in 3 steps.

カルボン酸の  $\alpha$  位にベンゼン環を有する誘導体 **52** は、Scheme 9 に従い、 $\beta$ -アミノ酸誘導体 **51** を **49** と縮合させた後、脱保護を行い、合成した。カルボン酸の  $\alpha$  位にアミド基を有する誘導体 **61a-j** の合成は、Scheme 10 に示す方法により行った。アミノ基をベンジルオキシカルボニル基 (Cbz) で保護した L-または D-アスパラギン **53, 54** を出発原料とし、ヨウドベンゼンジアセテートをヨウ素カチオン源としたホフマン転位反応を行い<sup>40)</sup>、続いてカルボン酸をメチルエステル化し、 $\beta$ -アミノ酸誘導体 **55, 56** へと導いた。これらを EDC, HOBT 存在下で前章の方法で合成したカルボン酸 **39** と縮合させ、**57, 58** に誘導した。次に、Cbz 基の水素接触還元による脱保護、水酸化リチウムによるエステル加水分解を経て、 $\alpha$ -アミノ酸誘導体 **59, 60** を得た。これらのアミノ基を Table 6 に示す様な各種酸クロライド、または酸無水物によりアシル化した後、Boc 基の塩酸による脱保護を行い、目的物 **61a-j** へと誘導した。この合成方法ではカルボン酸  $\alpha$  位不斉炭素のエピメリ化は殆ど起こっていないことを HPLC により確認している。



**Scheme 10.** Reagents and conditions: (a) PhI(OAc)<sub>2</sub>; (b) SOCl<sub>2</sub>, MeOH; 81% for **55**, 90% for **56** in 2 steps; (c) **39**, EDC, HOBT, DMF, 93% for **57**, 96% for **58**; (d) Pd-C/H<sub>2</sub>, EtOH; (e) LiOH; 97% for **59**, 95% for **60** in 2 steps; (f) acylating reagent (see Table 1); (g) HCl, AcOEt.

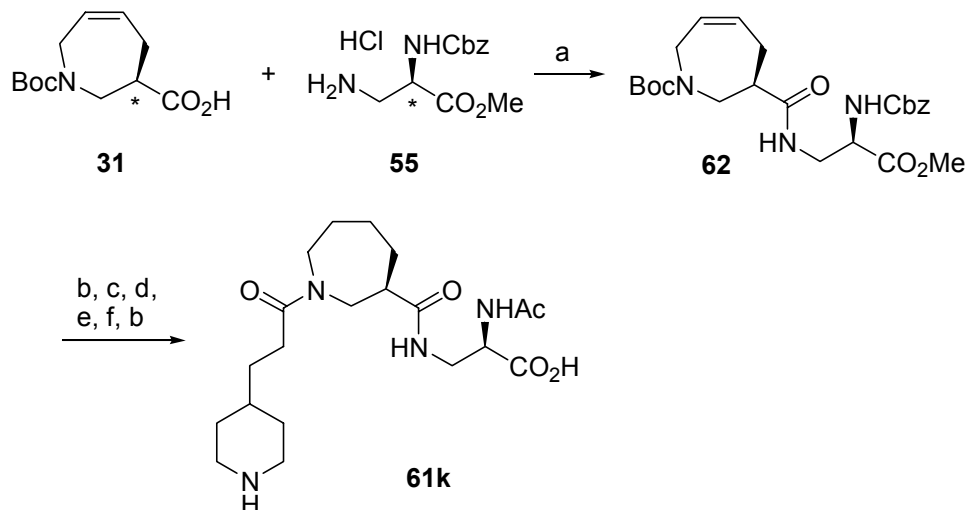
**Table 6.** Acylating reagents and product yields

Compd	R	Acylating Reagent	Stereo	Yield, % <sup>a</sup>
<b>50</b>	H	-	-	89 <sup>b</sup>
<b>52</b>	Ph	-	racemic	100 <sup>b</sup>
<b>61a</b>	NH <sub>2</sub>	-	(S)	60
<b>61b</b>	NHCOPh- <i>p</i> CN	<i>p</i> CN-PhCOCl	(S)	90
<b>61c</b>	NHCOPh- <i>p</i> OMe	<i>p</i> MeO-PhCOCl	(S)	94
<b>61d</b>	NHCOPh- <i>p</i> OMe	<i>p</i> MeO-PhCOCl	(R)	94
<b>61e</b>	NHAc	Ac <sub>2</sub> O	(S)	82
<b>61f</b>	NHAc	Ac <sub>2</sub> O	(R)	85
<b>61g</b>	NHCO <sup>n</sup> Hex	( <sup>n</sup> HexCO) <sub>2</sub> O	(S)	90
<b>61h</b>	NHCO <sup>cyc</sup> Hex	cycHexCOCl	(S)	86
<b>61i</b>	NHCO <sup>t</sup> Bu	<sup>t</sup> BuCOCl	(S)	86
<b>61j</b>	NHCO <sup>t</sup> Bu	<sup>t</sup> BuCOCl	(R)	79

<sup>a</sup> isolated yields from **59** or **60**    <sup>b</sup> isolated as HCl salt

また、G'Part に 7 員環構造を有する誘導体の合成を行った (Scheme 11)。第一章にて合成した (R) 配置を有する 7 員環光学活性アミノ酸誘導体 **31** と **55** を縮合し、**62** とした。**62** の Boc 基を脱保護、**39** と縮合、続いて Pd-C 触媒による水素還元にて、ベンジルオキシカルボニル基の除去、及び二重結合の還元を行った。その後 Scheme 10 の方法と同様の方法で、無

水酢酸をカルボン酸  $\alpha$  位のアミノ基のアシル化剤として用い目的物 **61k** へと誘導した。



**Scheme 11.** Reagents and conditions: (a) EDC, HOBT, DMF; (b) HCl, AcOEt; (c) **39**, EDC, HOBT, DMF; (d) Pd-C/H<sub>2</sub>, MeOH; (e) LiOH; (f) Ac<sub>2</sub>O.

## 2. 5. プロトタイプ変換化合物の薬理活性評価

得られたプロトタイプ変換化合物の IC<sub>50A</sub> 及び、IC<sub>50B</sub> を測定し、IC<sub>50B</sub>/ IC<sub>50A</sub> の値を測定した。結果を Table 7 に示す。プロトタイプ化合物 **50** のカルボン酸の  $\alpha$  位にフェニル基を導入した **52** の IC<sub>50A</sub> は 110 nM と **50** より 2 倍以上の活性向上が見られた。このことからカルボン酸の  $\alpha$  位に置換基を導入することにより活性が向上すると考えられる。このカルボン酸  $\alpha$  位はフィブリノゲン RGD ペプチドではアミド結合部分に相当するため、アミノ基またはアミド基を導入することにより、GPIIb/IIIa 蛋白との相互作用を向上させる効果が期待できる。しかし、この位置にアミノ基を導入した **61a** は IC<sub>50A</sub> が 272 nM と、プロトタイプ化合物 **50** よりも減弱する結果となった。しかしながら、IC<sub>50B</sub> 値が 2140 nM とそれ以上に減弱しており、IC<sub>50B</sub>/ IC<sub>50A</sub> の値はプロトタイプ化合物 **50** を上回る 7.87 という非常に高い安全係数を示すことが分かった。このアミノ基に各種のアシル化を施し、中性置換基であるアミド誘導体へと導いた。それらの活性を測定した結果、芳香族アミド置換基をアシル化した誘導体 **61b-d** では、IC<sub>50A</sub> は飛躍的に向上することが判明した。しかしながら、IC<sub>50B</sub>

**Table 7.** The structure-activity relationships and the investigation of safety margin.

Compd	R	Stereo	IC <sub>50</sub> (ADP induced aggregation), nM <sup>a</sup> (IC <sub>50A</sub> )	IC <sub>50</sub> (inhibition of vWF mediated adhesion), nM <sup>b</sup> (IC <sub>50B</sub> )	ratio (IC <sub>50B</sub> )/(IC <sub>50A</sub> )
<b>50</b>	H	-	241	335	1.39
<b>52</b>	Ph	racemic	110	NT	-
<b>61a</b>	NH <sub>2</sub>	(S)	272	2140	7.87
<b>61b</b>	NHCOPh- <i>p</i> CN	(S)	43	21	0.49
<b>61c</b>	NHCOPh- <i>p</i> OMe	(S)	32	13	0.41
<b>61d</b>	NHCOPh- <i>p</i> OMe	(R)	33	21	0.64
<b>61e</b>	NHAc	(S)	53	289	5.45
<b>61f</b>	NHAc	(R)	80	NT	-
<b>61g</b>	NHCO <sup>n</sup> hex	(S)	26	21	0.81
<b>61h</b>	NHCO <sup>o</sup> Hex	(S)	34	77	2.26
<b>61i</b>	NHCO <sup>t</sup> Bu	(S)	123	NT	-
<b>61j</b>	NHCO <sup>t</sup> Bu	(R)	37	94	2.54
<b>61k<sup>c</sup></b>	NHAc	(S)	44	NT	-
(Tirofiban)			46	6.7	0.15

<sup>a</sup> Concentration required to reduce binding ADP-induced human platelet aggregation response by 50%

<sup>b</sup> Concentration required to inhibit vWF mediated human platelet adhesion by 50%.

<sup>c</sup> G' part is 7membered ring structure

の値も並行して向上し、結果として IC<sub>50B</sub>/ IC<sub>50A</sub> の値は小さくなった。アシル基の芳香環上に電子吸引性置換基 (**61b**)や電子供与性置換基 (**61c, d**)を導入しても IC<sub>50A</sub> の値に大きな変化は見られなかった。さらに、このアミド基が置換された炭素原子の立体配置[(R) または (S)]の何れでも IC<sub>50A</sub> の値に大きな変化は見られなかった。すなわち、これら誘導体が GPIIb/IIIa に結合する空間、特にこのアミド部分の近傍には、フェニル基程度の大きさを受け入れる立体的な空間が存在していると推測できる。

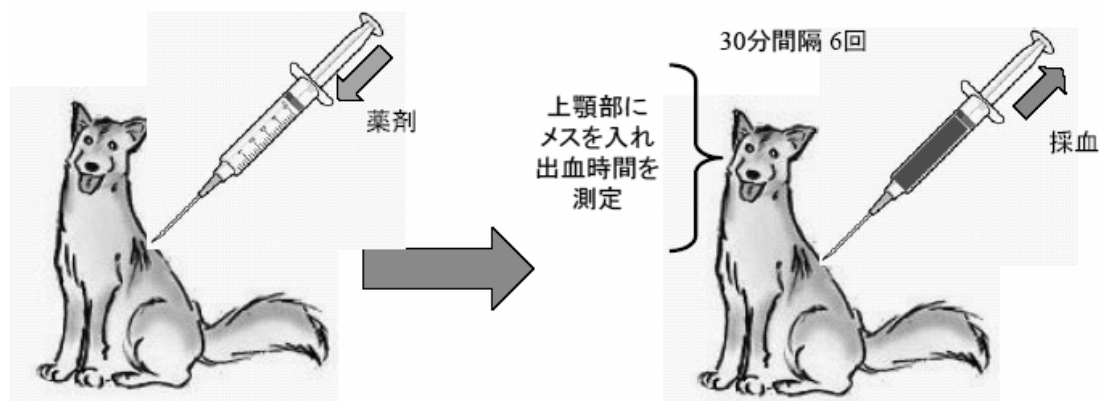
次に、アミド置換基を脂肪族アミドに変換し、活性と選択性の向上について検討した。その結果、最も単純な構造であるアセトアミド基を導入した誘導体 **61e** は、IC<sub>50A</sub> が 53 nM と非常に強い値を示し、IC<sub>50B</sub> 値も 289 nM と非常に弱い値に留まった。その結果、安全性の指標である IC<sub>50B</sub>/ IC<sub>50A</sub> 値は 5.45 と非常に高い値を示すことを見出した。**61e** のエピマーである **61f** はやや IC<sub>50A</sub> が減弱する傾向にあり、この場合は (R), (S)体間での活性に若干の差が見られた。また、アセトアミド基のアシル鎖を *n*-ヘキシル基に延長した **61g** は IC<sub>50A</sub> が向

上するものの、 $IC_{50}B$  値も向上し、その結果  $IC_{50}B/IC_{50}A$  値は **61e** ほど向上しない結果となった。これに対し環状構造を有し嵩高さをやや向上させたシクロヘキシル誘導体 **61h** では  $IC_{50}B$  値は、やや減弱した。この知見を基に、より嵩高い *tert*-ブチルアミド基を導入した **61i**, **j** を評価した。その結果、(*R*)配置を有する **61j** が高い  $IC_{50}A$  値 37 nM を示し、かつ  $IC_{50}B/IC_{50}A$  値は 2.54 と低い値を示すことが分かった。また興味深い結果として、カルボン酸  $\alpha$  位の立体異性体と活性との関係を *tert*-ブチルアミド誘導体 **61i**, **j** とアセトアミド誘導体 **61e**, **61f** の  $IC_{50}A$  値を元に精査した。その結果、*tert*-ブチルアミド誘導体エピマー **61i**, **j** ではカルボン酸  $\alpha$  位が (*R*) 配置の **61j** が高活性であるのに対し、アセトアミド誘導体エピマー **61e**, **61f** では (*S*) 配置の **61e** が高活性であるといった逆転現象が見られており、*tert*-ブチル基ほどの立体的に嵩高い置換基を有する **61i**, **j** では GPIIb/IIIa との何らかの立体的な障害が起こっているものと考えられる。また、G'部分に 7 員環  $\beta$ -アミノ酸を導入し、カルボン酸  $\alpha$  位に **61e** と同じアセトアミド基を導入した **61k** は、予期した通り、 $IC_{50} = 42$  nM と非常に高い血小板凝集抑制作用を示した。しかしながら **61e** と比較して明確な活性の差は見られなかったため、更なる検討は中止した。上に述べた *in vitro* (生体外)試験の結果より、カルボン酸  $\alpha$  位にアセトアミド基、及び *tert*-ブチルアミド基を有する誘導体 **61e**, **61j** が特に高い血小板凝集抑制活性と低い血小板粘着抑制作用を同時に併せ持つ誘導体であると結論づけ、次に実際に生体内において、この主作用と副作用の乖離が発現できるかを実証すべく、イヌを用いて血小板凝集抑制作用と出血時間延長作用の乖離度を測定した。

## 2. 6. イヌでの血小板凝集抑制作用と出血時間延長作用との乖離度測定

### 2. 6. 1. 測定方法

前項の *in vitro* (生体外) 試験で良好なプロファイルを示した 2 化合物 **61e**, **61j** を用いて、イヌでの血小板凝集抑制作用と出血時間延長作用との乖離度を測定し、生体内での有効性と安全性を確認する *in vivo* (生体内)実験を行った。実験方法は以下の通りである。まず、成犬ビーグルに薬剤を投与せずに 30 分間隔で 6 回、上顎部に一定の長さ、深さでメスを入れ



①血小板凝集を50%抑制するときの薬剤血中濃度を測定(C)

②薬剤無投与(Control)時に比べ、出血時間が2.5倍延長するときの薬剤血中濃度を測定(D)

(D)/(C) : 大きいほど安全性が高い薬剤

Figure 14. The measurement of the bleeding time and platelet aggregation inhibition in dog (イヌでの薬剤による血小板凝集抑制作用と出血時間延長作用の測定法)

た。各回メスを入れた後 1 分ごとにろ紙を傷口に付け、血がろ紙に付着しなくなるまでの時間を測定し、その時間を出血時間とした。次に、様々な投与量の薬剤 **61e** または **61j** を静脈注射し、同時に薬剤の血中濃度を維持するため、同薬剤の点滴投与も並行した。先程と同様に投与後から 30 分間隔で 6 回、メスを入れ、その出血時間を測定した。また、メスを入れるのと同時に採血を行い、その血液より血漿成分を分離し、血漿中の薬剤濃度を HPLC 測定により測定した。血漿中の薬剤濃度が高い場合、副作用である出血時間の延長が見られた。薬剤無投与時の出血時間に比べ、2.5 倍の出血時間の延長が見られた場合は明らかな副作用が発現したとみなし、そのときの血漿中薬剤濃度を計算した。本章ではこの値を (D) ng/ml とする。他方、第一章で述べた方法と同様に、採血を行った血漿成分に ADP を加え、血小板凝集を誘発させた。今回の場合、ある濃度の薬剤が血漿成分に存在するため、血小板は部分凝集抑制を起こす。血漿中の薬剤濃度は血漿成分の HPLC 測定により血中濃度が決定できる。その薬物濃度と血小板凝集抑制能の関係をプロットした。イヌにおける 50% 血小板凝集を抑制する時の薬剤濃度 (本章では (C) ng/ml とする) を算出した。この実験での比較対照として、上市されている Tirofiban に対しても同様の実験を行った。



## 2. 6. 2. 結果

前項で行った犬での実験結果を Table 8 に示す。イヌ血小板の 50%凝集抑制時の血漿中濃度 (C)は、化合物 **61e** では 46 ng/ml であり、化合物 **61j** では 31 ng/ml であった。対照薬剤の Tirofiban の値は、57 ng/ml であったことより、著者の合成した 2 つの化合物は、主作用の点

**Table 8.** The prolonging of the bleeding time and the inhibition of the platelet aggregation in dog  
(イヌにおける出血時間延長作用と血小板凝集抑制作用との乖離度)

Compd	concentration (C) <sup>a</sup> , ng/ml	concentration (D) <sup>b</sup> , ng/ml.	ratio (D)/(C)
<b>61e</b>	46 ± 4.0	770 ± 20	17
<b>61j</b>	31 ± 3.0	244 ± 12	7.8
(Tirofiban)	57 ± 1.0	148 ± 5.8	3.0

<sup>a</sup> Concentration required to reduce binding ADP induced dog's platelet aggregation response by 50%

<sup>b</sup>Plasma concentration of drugs in dog when bleeding time was 2.5 fold prolonging

では Tirofiban とほぼ同等の活性を生体内で示すことが分かった。これに対し、2.5 倍出血時間延長時薬剤濃度 (D)は、化合物 **2** では 770 ng/ml と非常に高い濃度を示したのに対し、化合物 **35i** では 244 ng/ml と中程度の値を示し、対照薬である Tirofiban の (D)は 148 ng/ml で、低い薬剤血中濃度の段階から出血傾向を示すことが分かった。また実験によって得られたこれら 2 つの値 (C), (D)の比 (D)/(C) を計算し、主作用と副作用の乖離度をそれぞれ算出した。(D)/(C)値が大きいほど、主作用と副作用の乖離度が大きく安全性の高い薬剤とみなすことができる。結果、化合物 **61e** では、この値は 17 であった。対照薬である Tirofiban の値 3.0 と比較すると、6 倍近くの安全性を確保できたことが分かった。化合物 **61j** も 7.8 と Tirofiban より約 2.6 倍安全性が向上したことが判明したが、化合物 **61e** の安全性には及ばなかった。この *in vivo* での試験結果は、前項で行った *in vitro* 試験の結果 (Table 7)と同様な傾向を示すことも分かり、*in vivo* 試験と *in vitro* 試験の相関性がある非常に信頼性の高い実験

であることも裏付けられた。

## 2. 7. 考察

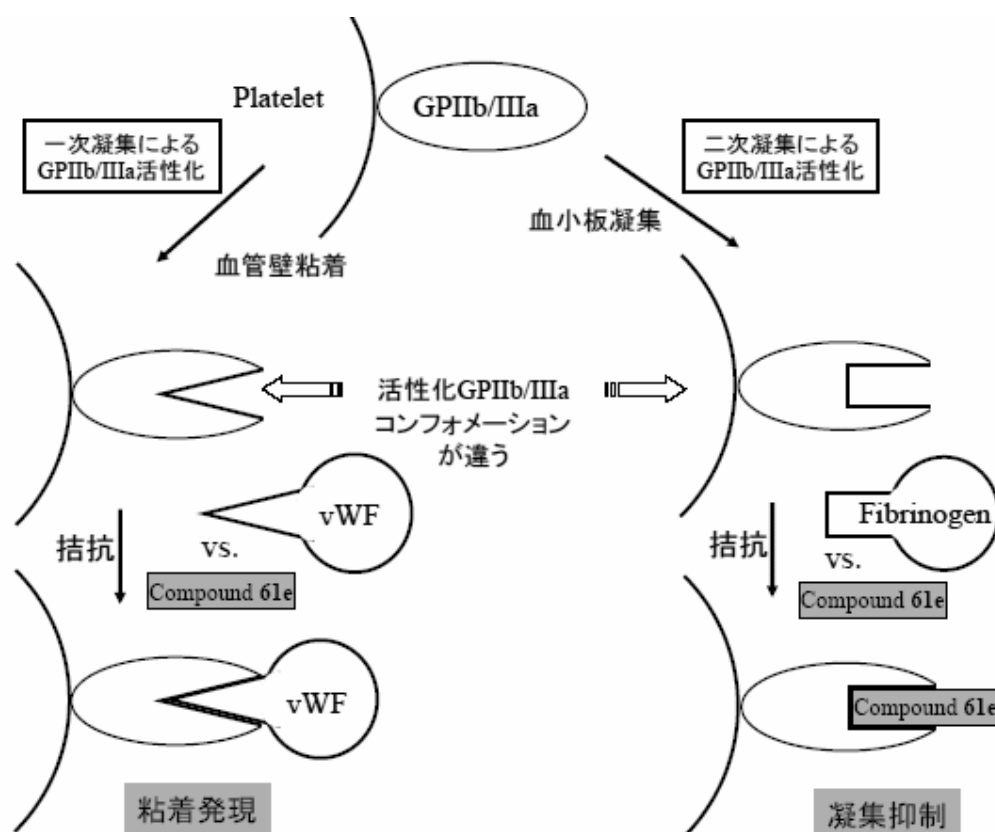


Figure 15. Proposed mechanism for the difference between the platelet aggregation and platelet adhesion of 61e (61eの凝集抑制作用と粘着抑制作用の差が起こるメカニズム)

化合物 61e は血小板凝集抑制能と出血時間延長作用との乖離が大きい非常に安全性の高い血小板凝集抑制剤といえる。ここでは、なぜ血小板凝集と血小板血管壁粘着作用との間に乖離が生じるのかについて考察する。血小板の血管壁への粘着 (一次凝集) と血小板同士の粘着 (二次凝集) は、その血小板上にある GPII/IIIa の活性化メカニズムが異なるため、それぞれの場合で活性化された GPIIb/IIIa の活性化コンフォメーションが異なるのではないかと推察できる。このことを模式的に Figure 15 に示した。一次凝集で活性化された場合の GPIIb/IIIa の活性中心には化合物 61e との相互作用が弱く、そのため、vWF との結合は阻害されない。それに対し、61e は二次凝集で活性化された GPIIb/IIIa の活性中心との親和性が高く、フィ

ブリノゲンとの結合を充分阻害できるため、血小板凝集を抑えることができる。従って、化合物 **61e** ではフィブリノゲン  $\alpha$  鎖の RGD  $\beta$ -ターン構造がより適切に再現されたため、このような乖離が生じたと考えられる。

## 2. 8. 小括

著者は主作用である強い血小板凝集抑制作用を有し、副作用である出血傾向を抑える安全性の高い血小板凝集抑制剤 **61e** の創出に成功した<sup>41)</sup>。この薬剤は、現在、急性期脳梗塞治療剤として開発すべく、臨床試験段階 (Phase I) にある。急性脳梗塞治療剤として抗血栓剤を使用する場合、これまでの抗血栓剤では出血傾向が生じる副作用が発生する恐れがある。この副作用により脳出血といった致命的な症状を併発する危険性があった。しかし、著者が見出した薬剤の場合、こういったリスクが最小限にとどめられる可能性があり、特に脳血管系での抗血栓剤として非常に有用な薬剤となると期待される。

## 2. 9. 実験の部

### 2.9.1. Chemistry

#### **(2*R,S*)-2-Phenyl-3-[(*R*)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]**

**propanoic acid hydrochloride (52).** This compound was prepared from **49** and **51** using a similar procedure to that employed for the preparation of **1b** (100%): IR (nujol) 1724, 1635, 1616  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1.05-1.85 (m, 11H), 2.02-2.60 (m, 4H), 2.60-3.06 (m, 3 H), 3.10-3.27 (m, 2H), 3.33-3.68 (m, 3H), 3.70-3.90 (m, 2H), 4.10-4.40 (m, 1H), 7.18-7.40 (m, 5H), 7.95-8.20 (m, 1H), 8.60-9.20 (m, 2H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 416.2549, found: 416.2535.

**Methyl (2*R*)-3-amino-2-[(benzyloxy)carbonylamino]propanoate hydrochloride (56).** To a stirred solution of iodobenzene diacetate (7.26 g, 22.5 mmol) in a mixture of EtOAc (44 ml), MeCN (44 ml) and water (22 ml) was added *N*-carbobenzoyl-D-asparagine (**54**) (5.0 g, 18.8 mmol) at ambient temperature. After stirred for 3 h, the reaction mixture was cooled to 5 °C, followed by stirring for 2 h. Insoluble material was collected by filtration, washed with EtOAc, and dried under reduced pressure to give (2*R*)-3-amino-2-[(benzyloxy)carbonylamino]propanoic acid (4.15 g, 93%) as a white solid: IR (KBr) 3303, 3028, 2949, 1693, 1657, 1624, 1593, 1543  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O-TFA}$ )  $\delta$  3.35 (dd,  $J = 13.4, 8.7$  Hz, 1H), 3.57 (dd,  $J = 13.4, 5.3$  Hz, 1H), 4.57 (dd,  $J = 8.7, 5.3$  Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 7.43 (s, 5H); MS (APCI)  $m/z$  239 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; mp 238 °C (dec.);  $[\alpha]_D^{31} +8.6^\circ$  ( $c$ 1.0, 1N NaOH aq).  $\text{SOCl}_2$  (3.22 ml, 44.1 mmol) was added dropwise to MeOH (25 ml) at 4 °C under a nitrogen atmosphere. After stirred for 30 min, to the reaction mixture was added the material obtained above (3.00 g, 12.6 mmol), followed by warming to the ambient temperature and

stirring was continued overnight. The insoluble material was collected by filtration, washed with IPE, and dried under a reduced pressure to give **56** (3.15 g, 87%) as a white solid: IR (KBr) 1734, 1695, 1595, 1537  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  3.06 (dd,  $J = 13.1, 9.2$  Hz, 1H), 3.22 (dd,  $J = 13.1, 4.8$  Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 4.38-4.49 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 7.37 (s, 5H), 7.92 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.20 (br-s, 3H); MS (APCI)  $m/z$  253 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; mp 166.0-166.5  $^\circ\text{C}$ ;  $[\alpha]_D^{30} +39.2^\circ$  ( $c$  1.0, MeOH).

**Methyl (2S)-3-amino-2-[(benzyloxy)carbonylamino]propanoate hydrochloride (55).** This compound was prepared from **53** using a similar procedure to that employed for the preparation of **56** (90%): IR (KBr) 1734, 1691, 1598, 1541  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  3.06 (dd,  $J = 13.1, 9.2$  Hz, 1H), 3.22 (dd,  $J = 13.1, 4.8$  Hz, 1H), 3.68 (s, 3H), 4.38-4.49 (m, 1H), 5.07 (s, 2H), 7.37 (s, 5H), 7.92 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 8.20 (br-s, 3H); MS (ESI)  $m/z$  253.3 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ;  $[\alpha]_D^{23} -43.1^\circ$  ( $c$  1.01, MeOH).

**tert-Butyl 4-[3-((3R)-3-(((2S)-2-[(benzyloxy)carbonylamino]-3-methoxy-3-oxopropyl)amino) carbonyl)-1-piperidinyl]-3-oxopropyl]-1-piperidinecarboxylate (57).** To a solution of **39** (20.0 g, 54.3 mmol), **55** (17.2 g, 59.7 mmol) and HOBT (5.07 g, 59.7 mmol) in DMF (10 ml) was added EDC (10.9 ml, 59.7 mmol) dropwise under ice cooling. The reaction mixture was stirred at 4  $^\circ\text{C}$  overnight. To the resulting solution was added water followed by extraction with EtOAc twice. The organic layer was washed with saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$  solution, water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane (1:1) to give **57** (30.5 g, 93%) as a colorless oil: IR (neat) 3307, 2974, 2933, 2855, 1724, 1689, 1535, 1434  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.95-1.15 (m, 2H), 1.20-1.80 (m, 9H), 1.46 (s, 9H), 2.15-2.50 (m, 4H), 2.56-2.67 (m, 2H), 3.15-3.45 (m, 3H),

3.45-3.75 (m, 2H), 3.69 (s, 3H), 3.95-4.20 (m, 4H), 4.25-4.55 (m, 1H), 5.12 (s, 2H), 6.41 (d,  $J = 8.8$  Hz, 3H), 7.25-7.45 (m, 5H); MS (APCI)  $m/z$  503 (M-Boc+H)<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl 4-[3-((3*R*)-3-(((2*R*)-2-((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)amino)carbonyl]-1-piperidinyl)-3-oxopropyl]-1-piperidinecarboxylate (58).** This compound was prepared from **39** and **58** using a similar procedure to that employed for the preparation of **57** (96%): IR (neat) 3309, 2974, 2935, 2860, 1726, 1689, 1535, 1435 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  0.80-1.15 (m, 2H), 1.15-1.90 (m, 9H), 1.38 (s, 9H), 2.00-2.80 (m, 6H), 2.80-4.00 (m, 6H), 3.61 (s, 3H), 4.10-4.45 (m, 2H), 5.04 (s, 2H), 7.36 (s, 5H), 7.64 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 7.95-8.15 (m, 1H); MS (ESI)  $m/z$  625.3 (M+Na)<sup>+</sup>.

**(2*S*)-2-Amino-3-(((3*R*)-1-{3-[1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl)amino}propanoic acid (59).** To a solution of **57** (9.70 g, 16.1 mmol) in MeOH (200 ml) was added 10% palladium on charcoal (1.94 g). The reaction mixture was stirred under H<sub>2</sub> atmosphere at room temperature for 3 h. The catalyst was filtered off and washed with MeOH. The filtrate was concentrated in vacuo. The residue was dissolved with THF (100 ml). To this was added 1 N aqueous LiOH solution (48.3 ml, 48.3 mmol) dropwise under ice cooling and stirred for further 0.5 h at 5 °C. The pH of the resulting solution was adjusted to 7 with 20% aqueous solution of KHSO<sub>4</sub>, and evaporated under vacuum to remove THF. The residual aqueous solution was purified by ODS column chromatography. The eluate was concentrated in vacuo and lyophilized to give **59** (7.08 g, 97%) as an amorphous solid: IR (KBr) 1691, 1649, 1427, 1244, 1165 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  0.90-1.22 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.48-1.60 (m, 2H), 1.61-1.80 (m, 4H), 1.80-2.10 (m, 1H), 2.35-2.55 (m, 4H), 2.70-2.88 (m, 2H), 2.95 (dd,  $J = 13.0, 10.6$  Hz, 1H), 3.12-3.38 (m, 1H), 3.62 (dd,  $J = 14.9, 6.8$  Hz, 1H), 3.77 (dd,  $J = 14.9, 3.4$  Hz, 1H), 3.82-4.10 (m,

3H), 3.90 (dd,  $J = 6.8, 3.4$  Hz, 1H), 4.15-4.40 (m, 1H); MS (APCI)  $m/z$  455 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2R)-2-Amino-3-(((3R)-1-{3-[1-(*tert*-butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl)amino]propanoic acid (60).** This compound was prepared from **58** using a similar procedure to that employed for the preparation of **59** (95%): <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  0.90-1.22 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.46-1.60 (m, 2H), 1.65-1.85 (m, 4H), 1.85-2.10 (m, 1H), 2.40-2.55 (m, 4H), 2.70-2.90 (m, 2H), 2.98 (dd,  $J = 12.8, 10.6$  Hz, 1H), 3.12-3.35 (m, 1H), 3.53-3.67 (m, 1H), 3.76 (dd,  $J = 3.7, 2.2$  Hz, 1H), 3.82-3.95 (m, 2H), 4.18-4.38 (m, 1H); MS (ESI)  $m/z$  455.3 (M+H)<sup>+</sup>.

**(2S)-2-Amino-3-(((3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl)carbonyl)amino]propanoic acid (61a).** To a solution **59** (200 mg, 0.44 mmol) in EtOAc (4 ml) was added 4 N HCl in EtOAc (1.10 ml, 4.40 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting precipitate was collected and washed with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum to give a crude solid. It was dissolved in water, and the pH of the solution was adjusted to 7.0 with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution. The resulting solution was purified by ODS column chromatography with MeCN/H<sub>2</sub>O (3:97). The eluate was concentrated in vacuo and lyophilized to give **61a** (94 mg, 60%) as an amorphous solid: IR (KBr) 1631, 1566, 1444, 1228, 1084 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  1.26-1.90 (m, 9H), 1.90-2.08 (m, 3H), 2.35-2.58 (m, 3H), 2.75-3.10 (m, 3H), 2.75-3.10 (m, 3H), 3.12-3.60 (m, 6H), 3.78-4.05 (m, 1H) 4.12-4.38 (m, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for C<sub>17</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 355.2345, found: 355.2331.

**(2S)-2-[(4-Cyanobenzoyl)amino]-3-(((3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl)carbonyl)amino]propanoic acid (61b).** To a suspension of **59** (204 mg, 0.45 mmol) in MeCN (5 ml) was added *N*-(trimethylsilyl)acetamide (MSA; 700 mg, 5.3 mmol), and the reaction mixture

was stirred at 40°C for 30 min and then cooled to 0 °C. To this solution was added *p*-cyanobenzoyl chloride (80 mg, 0.48 mmol) under ice cooling and the reaction mixture was stirred for further 0.5 h at room temperature. The pH of the resulting solution was adjusted to 2.5 with 20% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution and extracted with EtOAc, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in EtOAc (6 ml). To this was added 4 N HCl in EtOAc (2.1 ml, 8.4 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting precipitate was collected and washed with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum, dissolved in water, and the pH of the solution adjusted to 7 with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution. It was then purified by ODS column chromatography. The eluate was concentrated in vacuo and lyophilized to give **61b** (191 mg, 90%) as an amorphous solid: IR(KBr) 1641, 1630, 1610, 1444, 1390 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.25-1.62 (m, 7H), 1.62-1.82 (m, 2H), 1.82-2.02 (m, 3H), 2.25-2.52 (m, 3H), 2.70-3.12 (m, 3H), 3.23 (dd, *J* = 13.2, 10.6 Hz, 1H), 3.35-3.48 (m, 2H), 3.56-3.83 (m, 3H), 4.05-4.22 (m, 1H), 4.58-4.78 (m, 1H), 7.92 (d, *J* = 1.6 Hz, 4H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>34</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 484.2560, found: 484.2577; Anal. Calcd for C<sub>25</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>·2H<sub>2</sub>O: C, 57.79; H, 7.17; N, 13.47. Found: C, 57.65; H, 7.21; N, 13.42.

**(2*S*)-2-[(4-Methoxybenzoyl)amino]-3-[(*(3R)*-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonyl)amino]propanoic acid (61c).** This compound was prepared from **59** and *p*-methoxybenzoyl chloride using a similar procedure to that employed for the preparation of **61b** (94%): IR (KBr) 1644, 1640, 1633, 1622, 1608, 1502 1254, 1180, 1022, 850 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.20-1.60 (m, 7H), 1.60-1.75 (m, 2H), 1.75-2.00 (m, 3H), 2.15-2.30 (m, 1H), 2.30-2.50 (m, 2H), 2.65-2.85 (m, 1H), 2.85-3.05 (m, 2H), 3.20 (dd, *J* = 13.4, 10.4 Hz, 1H), 3.40-3.48 (m, 2H), 3.55-3.85 (m, 3H), 3.90 (s, 3H), 4.05-4.20 (m, 1H), 4.55-4.71 (m, 1H), 7.09 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.80 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd



for  $C_{25}H_{37}N_4O_6$  (M+H)<sup>+</sup>: 489.2713, found: 489.2713.

**(2R)-2-[(4-Methoxybenzoyl)amino]-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]propanoic acid (61d).** This compound was prepared from **60** and *p*-methoxybenzoyl chloride using a similar procedure to that employed for the preparation of **61b** (94%): IR (KBr) 1647, 1608, 1254, 1180, 1024, 850  $cm^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O)  $\delta$  1.25-1.60 (m, 7H), 1.60-1.78 (m, 2H), 1.78-2.00 (m, 3H), 2.27-2.50 (m, 3H), 2.70-3.20 (m, 3H), 3.22 (dd, *J* = 13.6, 10.3 Hz, 1H), 3.30-3.49 (m, 2H), 3.53-3.88 (m, 2H), 3.91 (s, 3H), 4.05-4.30 (m, 1H), 4.60-4.72 (m, 1H), 7.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.81 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for  $C_{25}H_{37}N_4O_6$  (M+H)<sup>+</sup>: 489.2713, found: 489.2721.

**(2S)-2-(Heptanoylamino)-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]propanoic acid (61g).** To a suspension of **59** (200 mg, 0.44 mmol) in THF (4 ml) were added 1 N aqueous NaOH solution (1.45 ml, 1.45 mmol) and hexanoic anhydride (0.26 ml, 0.97 mmol) under ice cooling. After 15 min, the reaction mixture was stirred at room temperature for further 1 h. The resulting mixture was washed with Et<sub>2</sub>O, and the pH of the aqueous layer was adjusted to 2.0 with 20% aqueous solution of KHSO<sub>4</sub>, and extracted with a mixed solvent of EtOAc/THF (1:1), dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in EtOAc (10 ml). To this was added 4 N HCl in EtOAc (1.1 ml, 4.4 mmol) under ice cooling. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting precipitate was collected and washed with Et<sub>2</sub>O and dried under vacuum, dissolved in water, and the pH of the solution was adjusted to 7 with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution. The solution was then purified by ODS column chromatography with MeCN/H<sub>2</sub>O (1:3). The eluate was concentrated in vacuo and lyophilized to give **61g** (184 mg, 90%) as an amorphous solid: IR (KBr) 3430, 3413, 1648, 1456,

1392  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  0.86 (t,  $J = 6.5$  Hz, 3H), 1.20-1.80 (m, 17H), 1.80-2.05 (m, 3H), 2.29 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.42-2.55 (m, 2H), 2.73-3.06 (m, 3H), 3.07-3.34 (m, 1H), 3.35-3.50 (m, 3H), 3.66 (ddd,  $J = 13.8, 4.2, 3.0$  Hz, 1H), 3.77-3.98 (m, 1H), 4.12-4.38 (m, 1H), 4.39 (dd,  $J = 8.9, 4.2$  Hz, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_5$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 467.3233, found: 467.3231.

**(2S)-2-(Acetylamino)-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino] propanoic acid (61e).** This compound was prepared from **59** using a similar procedure to that employed for the preparation of **61g** (82%). Purified amorphous product was crystallized from  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$  (0.5/99.5): mp >210  $^\circ\text{C}$ ; IR (KBr) 1633, 1624, 1444, 1396  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.30-2.10 (m, 11H), 2.03 (s, 3H), 2.30-2.60 (m, 3H), 2.70-3.10 (m, 3H), 3.10-3.55 (m, 4H), 3.69 (dt,  $J = 13.9, 4.2$  Hz, 1H), 3.80-4.05 (m, 1H), 4.10-4.35 (m, 1H), 4.38 (dd,  $J = 8.4, 4.2$  Hz, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 397.2456, found: 397.2438; Anal. Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : C, 50.65; H, 8.50; N, 12.44. Found: C, 50.51; H, 8.54; N, 12.33;  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -11.8^\circ$  ( $c$  1.00, MeOH).

**(2R)-2-(Acetylamino)-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino] propanoic acid (61f).** This compound was prepared from **60** using a similar procedure to that employed for the preparation of **61g** (85%). Purified amorphous solid was crystallized from  $\text{H}_2\text{O} / \text{EtOH}$  (0.5:99.5): mp >124.0-124.5  $^\circ\text{C}$ ; IR (KBr) 1666, 1627, 1599, 1402, 1144  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.30-2.10 (m, 11H), 2.03 (s, 3H), 2.30-2.65 (m, 3H), 2.80-3.10 (m, 3H), 3.10-3.50 (m, 4H), 3.69 (dt,  $J = 13.9, 4.2$  Hz, 1H), 3.80-4.00 (m, 1H), 4.10-4.35 (m, 1H), 4.38 (dd,  $J = 8.4, 4.2$  Hz, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 397.2456, found ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  397.2451; Anal. Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ : C, 50.65; H, 8.50; N, 12.44. Found: C, 50.88; H, 8.51; N, 12.49;  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -45.9^\circ$  ( $c$  1.00, MeOH).

**(2S)-2-[(Cyclohexylcarbonyl)amino]-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]propanoic acid (61h).** This compound was prepared from **59** using a similar procedure to that employed for the preparation of **61b** (86%): IR (KBr) 1643, 1637, 1633, 1523, 1469, 1441, 1255, 1225  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.20-1.80 (m, 18H), 1.80-2.05 (m, 3H), 2.15-2.60 (m, 4H), 2.73-3.15 (m, 3H), 3.20-3.35 (m, 1H), 3.35-3.52 (m, 3H), 3.66 (dt,  $J = 14.0, 3.9$  Hz, 1H), 3.78-3.95 (m, 1H), 4.20-4.34 (m, 1H), 4.38 (dd,  $J = 8.5, 4.4$  Hz, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{24}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_5$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 465.3077, found 465.3077.

**(2S)-2-[(2,2-Dimethylpropanoyl)amino]-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]propanoic acid (61i).** This compound was prepared from **59** using a similar procedure to that employed for the preparation of **61b** (86%): IR (KBr) 1631, 1541, 1390, 1230  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.19 (s, 9H), 1.33-1.89 (m, 8H), 1.90-2.05 (m, 3H), 2.42-2.56 (m, 3H), 2.83-3.18 (m, 3H), 3.20-3.58 (m, 4H), 3.62-3.74 (m, 1H), 3.80-3.95 (m, 1H), 4.10-4.30 (m, 1H), 4.30-4.38 (m, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 439.2920, found: 439.2942.

**(2R)-2-[(2,2-Dimethylpropanoyl)amino]-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]propanoic acid (61j).** This compound was prepared from **60** using a similar procedure to that employed for the preparation of **61b** (79%): IR (KBr) 1631, 1541, 1390, 1228  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.19 (s, 9H), 1.28-1.88 (m, 8H), 1.90-2.05 (m, 3H), 2.30-2.60 (m, 3H), 2.75-3.25 (m, 3H), 3.28-3.49 (m, 2H), 3.53 (dd,  $J = 8.1, 5.2$  Hz, 1H), 3.61 (dd,  $J = 8.5, 4.0$  Hz, 1H), 3.52-3.98 (m, 1H), 4.12-4.28 (m, 1H), 4.30-4.44 (m, 2H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{39}\text{N}_4\text{O}_5$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 439.2920, found: 439.2903.

**tert-Butyl (3R)-3-(((2S)-2-((benzyloxy)carbonyl)amino)-3-methoxy-3-oxopropyl)amino]carbonyl]-2,3,4,7-tetrahydro-1H-azepine-1-carboxylate (62).** To a solution of **31** (142 mg, 0.59 mmol) in DMF (5 ml) was added **55** (188 mg, 0.65 mmol), HOBT (88 mg, 0.65 mmol) and EDC (118  $\mu$ L, 0.65 mmol) successively. After the mixture was stirred at room temperature overnight, the reaction was quenched by adding saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, and extracted with EtOAc. The extract was washed with water, and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane (1:5) to give **62** (94 mg, 34%) as a colorless oil: <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.74-0.97 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 2.34-2.79 (m, 3H), 3.39-3.86 (m, 4H), 3.74 (s, 3H), 4.07-4.49 (m, 2H), 5.11 (s, 2H), 5.56-6.07 (m, 3H), 7.34 (m, 5H), 8.17 (br, 1H); MS(APCI) *m/z* 376 (M-Boc+H)<sup>+</sup>.

**(2S)-2-(Acetylamino)-3-(((3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]hexahydro-1H-azepin-3-yl)carbonyl)amino]propanoic acid (63).** To a solution of **62** (90 mg, 0.19 mmol) in EtOAc (2.0 ml) was added 4 N HCl in EtOAc (4.0 mmol). After the mixture was stirred for 2 h, the solvent was removed by decantation. The residue was dried in vacuo and dissolved in DMF (2 mL). To the solution were added **39** (54 mg, 0.21 mmol), HOBT (28 mg, 0.21 mmol), and EDC (0.10 mL, 0.55 mmol). After stirring at room temperature overnight, the mixture was quenched by a saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, then extracted with EtOAc. The extract was washed with water, and brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo. The crude residue was dissolved in MeOH (10 mL). The solution was stirred under H<sub>2</sub> atmosphere in the presence of 10% Pd-C (20 mg, 50% wet). After stirring at room temperature for 3 h, 1 N LiOH solution (0.50 mL, 0.50 mmol) was added to the mixture at 0 °C. After stirring at the same temperature for 30 min, acetic anhydride (28  $\mu$ L, 0.30 mmol) was added successively, and the mixture was stirred for further 30 min. The resulting mixture was acidified to pH 2.5 with 20% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, and extracted with

EtOAc. The extract was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and evaporated in vacuo. The residue was dissolved in EtOAc (2 mL), and 4 N HCl solution in EtOAc (1.0 mL, 4.0 mmol) was added. After the mixture was stirred at room temperature for 1 h, the solvent was removed by decantation. The residue was dried in vacuo, and dissolved in water. The solution was neutralized with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, then purified by Daisogel SP-120<sup>®</sup> (Daiso) reversed phase gel chromatography with a CH<sub>3</sub>CN/water (1:10). The fraction containing a product was concentrated in vacuo and lyophilized to give **63** (28 mg, 36%) as a white powder: IR (KBr) 3122, 1623, 1550, 1437 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.32-1.94 (m, 13H), 2.03 (s, 3H), 2.45-2.65 (m, 3H), 2.92-2.99 (m, 2H), 3.30-3.72 (m, 8H), 4.34-4.41 (m, 1H); MS(APCI) *m/z* 411 (M+H)<sup>+</sup>.

### 2.9.2. Platelet adhesion to vWF coated plate

Venous blood from healthy male volunteers was collected onto sodium citrate. Platelet rich plasma (PRP) was prepared by rapid centrifugation of whole blood. Platelets were washed with modified HEPES-Tyrode's buffer (129mM NaCl, 2.8 mM KCl, 0.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 5.5 mM Glucose, 0.1 % bovine serum albumin (BSA), pH7.4) containing 1 μM PGE 1. After washing, platelets were suspended in modified HEPES-Tyrode's buffer containing 1.0 mM CaCl<sub>2</sub> and platelet count was adjusted. Adhesion assay protocol was performed as follows. 96-well microtiter plates were coated with 1 μg/well of von Willebrand factor. The plates were then blocked with 1 % BSA. After the plates were washed with buffer, ADP-activated washed platelets were added to each well in the presence of drugs or buffer and incubate for 30 min at 37 °C. The plates were then washed three times with buffer. The number of adhered cells was determined by the acid phosphatase activity of cells at 410 nm using a microplate reader.

**2.9.3. Calculation of the plasma concentrations for 50% inhibition of platelet aggregation and for 2.5-fold prolongation of the bleeding time in dogs.**

Various amounts of **61e**, **61j** and tirofiban were administrated by bolus injection, followed by continuous injection (**61e**: 20 µg/kg + 7 µg/kg/h, 100 µg/kg + 30 µg/kg/h, 200 µg/kg + 70 µg/kg/h, and 500 µg/kg + 150 µg/kg/h; **61j**: 3 µg/kg + 3 µg/kg/h, 10 µg/kg + 10 µg/kg/h, 30 µg/kg + 30 µg/kg/h, and 60 µg/kg + 60 µg/kg/h; tirofiban: 39 µg/kg + 1.3 µg/kg/h, 75 µg/kg + 2.5 µg/kg/h, 150 µg/kg + 5 µg/kg/h, and 300 µg/kg + 10 µg/kg/h) to dogs (beagle; n = 2-4), respectively. Blood samples were taken at 6 time-points for the platelet aggregation study *ex vivo* and for measurement of drug concentrations in plasma by HPLC analyses at 30 min intervals after dosing. At the same time as blood sample collection, bleeding time was assessed with an automated spring-loaded device designed to produce a standardized incision applied to the inner side of the upper jowl. Blood from the incision was blotted with filter paper every 30 sec until all bleeding had stopped. Prolongation of bleeding time was determined by comparison with the time in the pretreatment period. Drug concentrations in plasma for 2.5-fold prolongation were calculated.

### 第3章 血小板凝集抑制経口剤の創出

#### 3. 1. 経口剤創出の意義と課題

前章で述べたように、著者は、出血傾向の低い、安全性の高い注射剤の創出を達成した。一般的に注射剤は投与後、直ちに血中から全身や疾患部位に運ばれるため、素早く薬効が現れる利点があり、重症患者、入院患者の投与には大変有効である。しかし、通院患者にとって注射剤投与は、投与の度に通院をしなくてはならず、患者自身の身体的負担、苦痛も大きい。従って、経口投与可能な血小板凝集抑制剤の創出は、患者の生活の質 (=Quality of Life; QOL)の向上の点においても大変意義深いものである。また血栓予防のための薬剤投与といった点からも経口抗血栓剤の需要も大きい。こうした背景から、著者は、経口投与可能な新規抗血小板剤の創出に着手した<sup>39c)</sup>。経口剤を創出する上での課題は、高い血小板凝

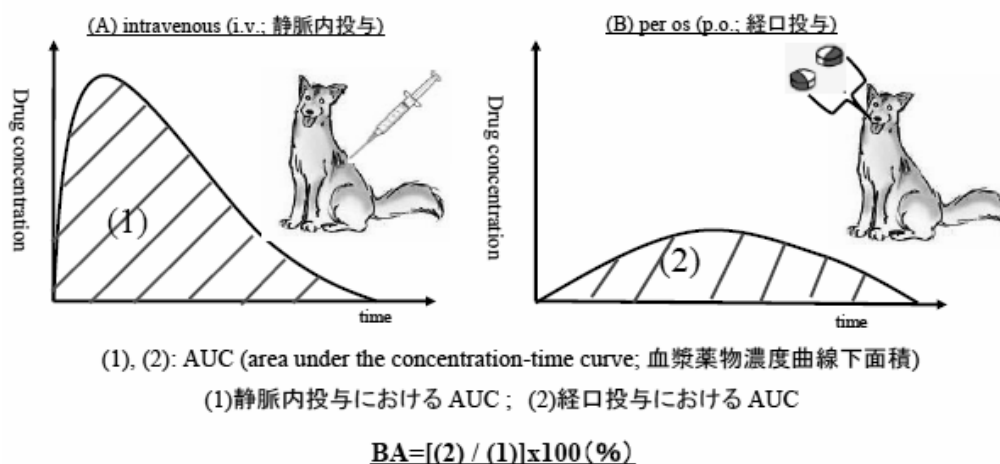


Figure 16. The measurement of bioavailability (BA) (生物学的利用率(BA)の測定法)

集抑制活性の発現とともに、如何に消化管からの吸収性の高い薬剤を創出する点にある。経口血小板凝集抑制剤を創出するに当たって、著者は、経口吸収性を示す指数、すなわち生物学的利用率 (bioavailability; 以下 BA) の測定を行った。BA とは、経口投与した薬剤が消化管からどれだけの割合で吸収されるかを示す指数である。Figure 16 に BA の測定方法

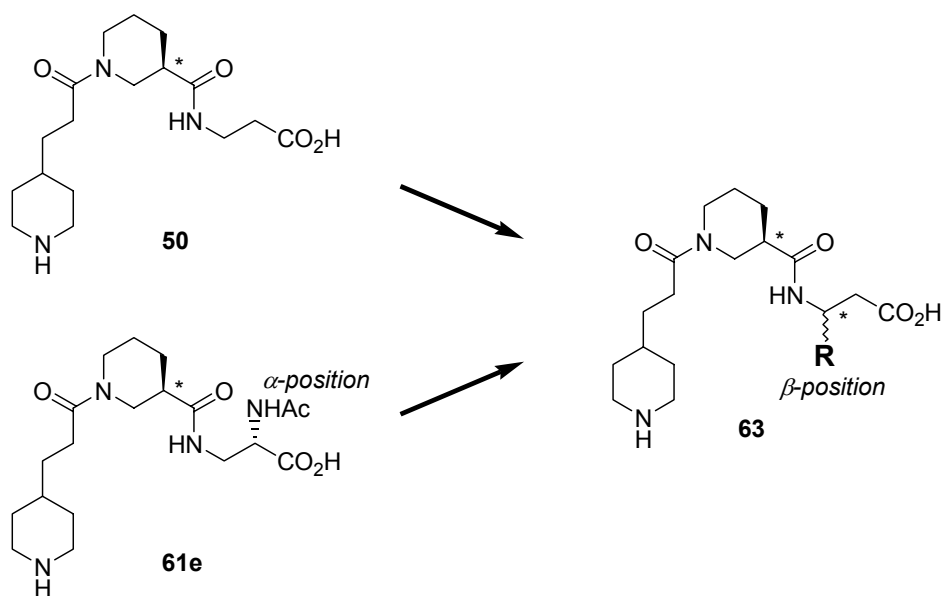
を示す。まず実験動物に、一定量の測定薬剤を静脈注射 (intravenous; i.v.) する。その後、定期的に採血を行い、薬剤の血漿中濃度の時間推移をグラフにプロットする (グラフ (A))。同種の動物に、絶食下または非絶食下にて、同量の薬剤を経口投与 (per os; p.o.)する。この場合も同様に投与後定期的に採血を行い、薬剤の血液中濃度の時間推移をグラフにプロットする (グラフ (B))。それぞれの場合において、図に示した斜線部分の面積を算出する。この面積は血漿薬物濃度の時間積分を示す。この積分値を血漿中薬物濃度曲線下面積 (Area under the concentration-time curve; AUC) と呼ぶ。静脈内注射投与時の AUC は、経口投与された薬剤が 100%消化管より吸収され血中に移行した場合の AUC に等しいとみなすことができる。すなわち、 $AUC(\text{経口投与})/AUC(\text{静脈内投与})$  の値を算出することで、どれだけの割合で薬剤が吸収されたかを測定できる。この値が BA である。著者が前章にて見出した注射剤 **61e** の経口吸収性を測定したところ、ラット絶食時における BA は 0.8%と殆ど経口吸収性が無く、**61e** をそのまま経口剤として使用するのとは不可能であることが判明した。

### 3. 2. 経口吸収性を考慮した血小板凝集抑制剤の分子設計

薬剤 **61e** が低い経口吸収性を示す原因を次のように推察した。一般に薬剤を経口投与した場合、主に小腸の腸間膜から吸収される。この腸間膜は脂質二重膜でできており、脂溶性物質は膜を通りやすい。しかし、水溶性に富む物質は膜を通りにくく、血中に移行しない。**61e** は水溶性に富む化合物であるため、腸間膜を通りにくいと考えられる。一般に化合物の脂溶性を示す実測値として、水-オクタノール分配係数 (LOGP) という数値を用いる。LOGP は、ある化合物のオクタノール-水 (1 : 1 (体積比))二層系溶媒系において、それぞれの層に溶解している化合物の比を対数で示したものである。すなわち、この値が大きいほど脂溶性のオクタノールに溶けている割合が多いことを示し、脂溶性の高い物質であることがわかる。著者は、脂溶性を予測するための手段として分子設計の段階において LOGP の計算値である CLOGP を参考にした。CLOGP とは、Daylight 社のソフトウェア CLOGP を用いて算出した LOGP の値であり、分子を複数のグループ (官能基) に分割し、各グループ毎に決められたパラメータの和を用いて計算される。**61e** の CLOGP を算出すると、-2.884



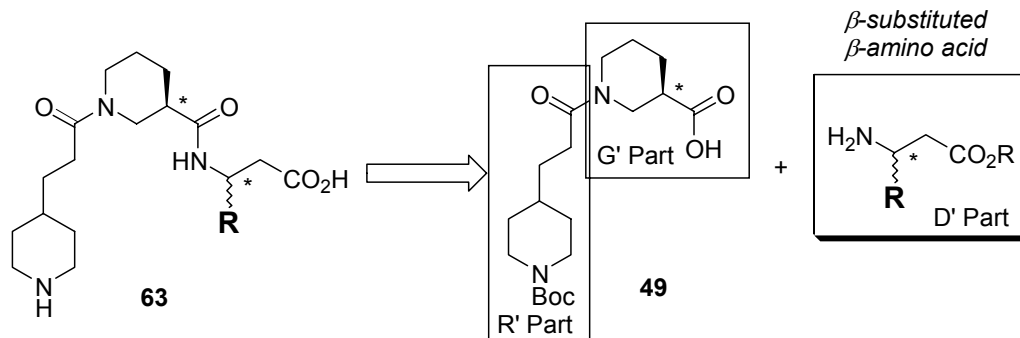
という値を示し、非常に水溶性に富む化合物であることが裏付けられた。水溶性が高いのは、分子内にカルボン酸、アミノ基に加え3つのアミド基を有しているためである。分子両末端のカルボン酸及びアミノ基は活性発現に必須な官能基であり、これらを除去することはできない。カルボン酸 $\alpha$ 位のアセトアミド置換部位に脂溶性置換基を導入することは可能である。第一章で述べたプロトタイプ化合物 **50** に脂溶性置換基を導入し、血小板凝集抑制活性を向上できるならば、分子の脂溶性向上により高い経口吸収性を有する薬剤を見出せるのではないかと推察した。しかし、第2章での注射剤探索研究によりカルボン酸 $\alpha$ 位に脂溶性置換基、例えばフェニル基を導入しても大幅な活性の向上が見られないことが分かっているので、これまで注目しなかったプロトタイプ化合物カルボン酸 $\beta$ 位に脂溶性置換基を導入することとした (**63**, Figure 17)。また経口剤創出における重要な参考パラメータとなる CLOGP 値も、設計化合物について算出した。



**Figure 17.** Synthetic strategy for the creation of orally-active anti-platelet agents.

### 3. 3. 血小板凝集抑制経口剤の合成

#### 3. 3. 1. 合成方法

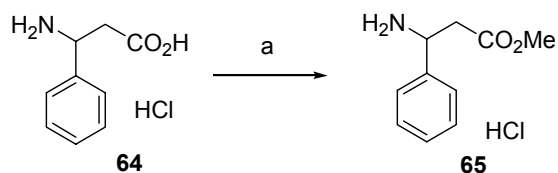


**Scheme 12.** Retro-synthesis of the target molecule **63**.

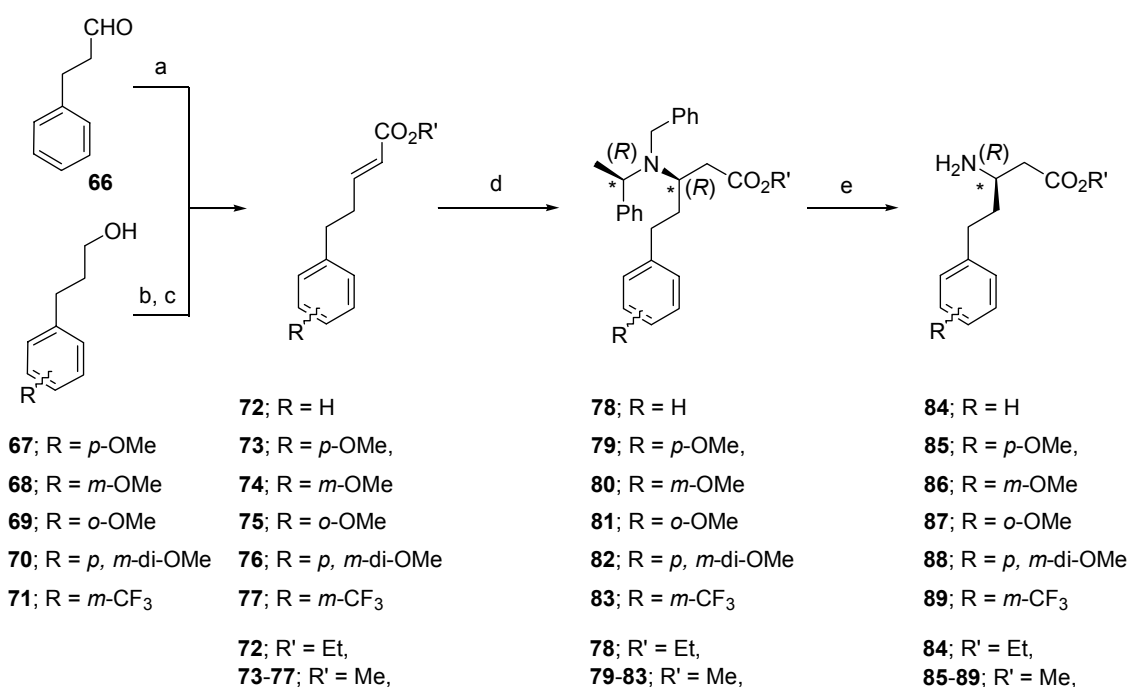
設計化合物 **63** の逆合成を Scheme 12 に示す。R'Part および G'Part を縮合した中間体 **49** は、前章で合成した化合物である。ここでは D'Part の光学活性  $\beta$  置換  $\beta$ -アミノ酸の合成が鍵となる。以下に種々の置換基 (R) を  $\beta$  位に持つ光学活  $\beta$ -アミノ酸誘導体の合成を示す。

#### 3. 3. 2. $\beta$ 置換 $\beta$ -アミノ酸エステルの合成

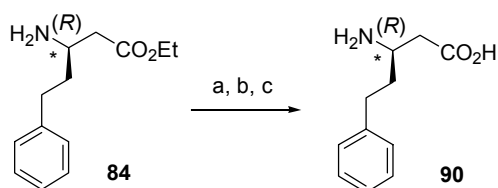
$\beta$  位にフェニル基を持つ(±) $\beta$ -アミノ酸 **64** は市販品として購入可能である。このラセミ誘導体 **64** のカルボン酸部分をエステル化して、化合物 **65** を得た (Scheme 13)。この  $\beta$ -アミノ酸 **65** はラセミ体のまま最終目的物 **63a, b** まで誘導し、最終段階で光学分割を行った (後述)。



**Scheme 13.** Reagents:(a)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH, 81%.



**Scheme 14.** Reagents:(a) NaH, (EtO)<sub>2</sub>POCH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>Et, THF, 59%; (b) DMSO, (COCl)<sub>2</sub>, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (c) Ph<sub>3</sub>P=CHCO<sub>2</sub>Me, 84% for **73**, 82% for **74**, 70% for **75**, 87% for **76**, 73% for **77** in 2 steps respectively; (d) (*R*)-*N*-benzyl-1-phenylethylamine, *n*-BuLi, THF, -70 °C, 72% for **78**, 97% for **79**, 73% for **80**, 66% for **81**, 70% for **82**, 74% for **83**; (e) Pd-C/H<sub>2</sub>, 83% for **84**, 87% for **85**, 95% for **86**, 100% for **88**, 75% for **89**, 45% for **90**.

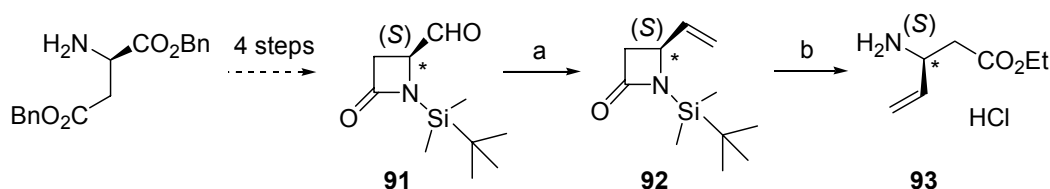


**Scheme 15.** Reagents:(a) PhCH<sub>2</sub>OCOCI, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>,47%; (b) LiOH, THF-EtOH; (c) H<sub>2</sub>, Pd-C, MeOH, 84% in 2 steps; **90**: [α]<sub>D</sub><sup>24</sup>-26.4° (c, H<sub>2</sub>O)

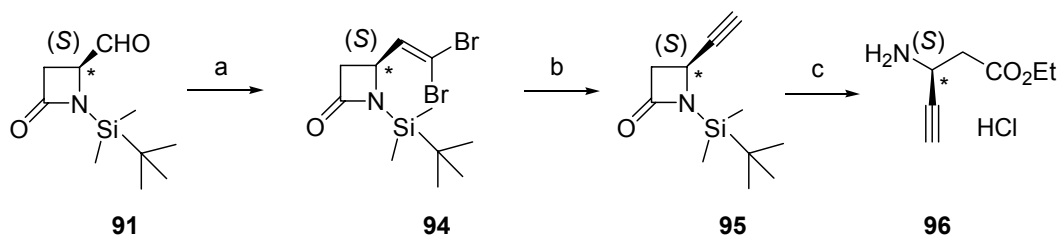
次に、β位にフェニルエチル置換基を持つβ-アミノ酸誘導体の合成法を Scheme 14 に示す。3-フェニルプロピオンアルデヒド (**66**)、または置換フェニルプロパノール **67-71** の Swern 酸化で得られるアルデヒド中間体に各種 Wittig 試薬を作用させ、α,β 不飽和エステル体 **72-77** に誘導した。次に、Davis らの方法に従い、(*R*)-*N*-ベンジル-α-メチルベンジルアミンリチウム塩を、**72-77** にジアステレオ選択的に共役付加させ、化合物 **78-83** を得た<sup>40)</sup>。この共役付加反応はいずれの場合も高いジアステレオ選択性を示し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる生成物の単離では、容易に高純度のジアステレオマーを得ることができた (**78**; 93% de)。**78-83** を Pd 触媒を用いる水素添加反応により、ベンジル基及びα-メ

チルベンジル基を脱保護し、 $\beta$ -アミノ酸エステル **84-89** に誘導した。これら誘導体の不斉点の立体配置は、Scheme 15 に示す方法により決定した。すなわち  $\beta$ -アミノエステル体 **84** のアミノ基をベンジルオキシカルボニル基で保護した後、エステル部分のアルカリ加水分解、Pd-C による水素添加反応を経て、文献既知の  $\beta$ -アミノ酸 **90** に誘導した。**90** の旋光度の比較により、その絶対立体配置は (*R*) と決定し、旋光度の値より光学純度は 93% ee であると決定した<sup>43)</sup>。

$\beta$  位にビニル基、エチニル基を有する  $\beta$ -アミノ酸誘導体に関しては、Scheme 16, 17 に示す方法により合成した。文献既知の方法に従い L-アスパルギン酸ジベンジルエステルから誘導したアルデヒド **91** を出発原料として用いた<sup>44)</sup>。亜鉛粉末、ヨウ化メチレン、チタニウムテトライソプロポキシド を用いてアルデヒド部分をメチレン化し、**92** とした<sup>45)</sup>。この **92** の  $\beta$ -ラクタム環を塩酸—エタノール溶液で開環させ、ビニル置換  $\beta$ -アミノ酸 **93** へと誘導した (Scheme 16)。エチニル誘導体 **96** へは、アルデヒド **91** を、トリフェニルホスフィン存在下で四臭化炭素と反応させ、ジブロモ誘導体 **94** に変換した後、LiN(TMS)<sub>2</sub> を作用させ、エチニル置換体 **95** に誘導した。**95** の  $\beta$ -ラクタム環も同様に塩酸—エタノール溶液で開環



**Scheme 16.** Reagents:(a) Zn, CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub>, Ti(O<sup>i</sup>Pr)<sub>4</sub>, THF, 50%; (b) HCl, EtOH, 79%.



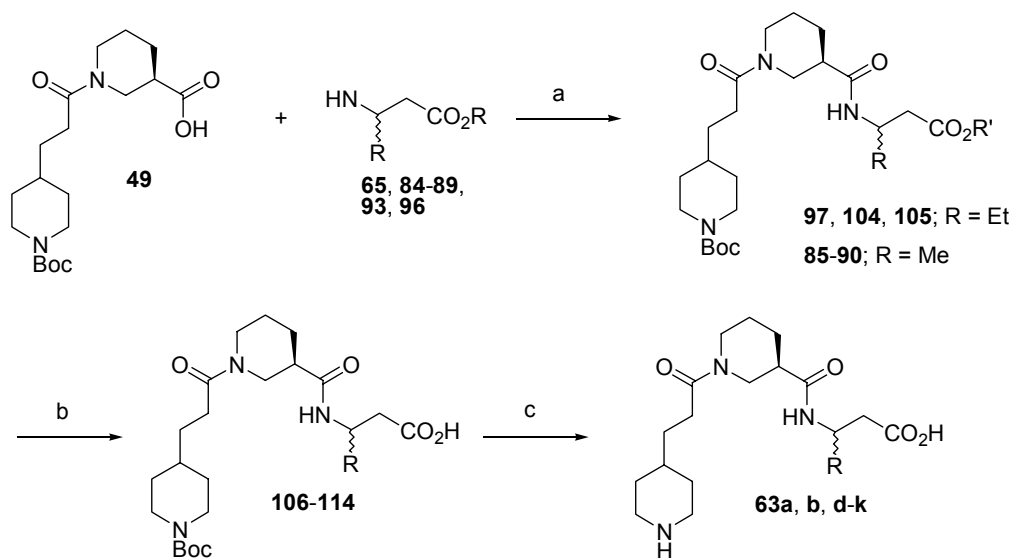
**Scheme 17.** Reagents:(a) CBr<sub>4</sub>, PPh<sub>4</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 48%; (b) LiN(TMS)<sub>2</sub>, 56%; (c) HCl, EtOH, 56%.

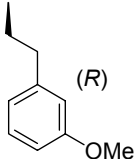
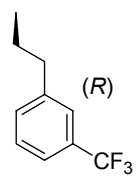
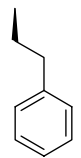
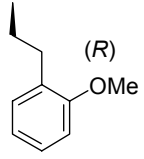

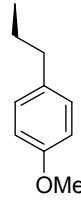
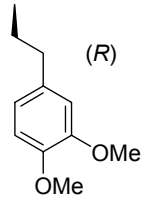

させ、 $\beta$ -アミノ酸 **96** へと誘導した (Scheme 17)。<sup>46)</sup>

### 3. 3. 3. 経口剤候補化合物への誘導

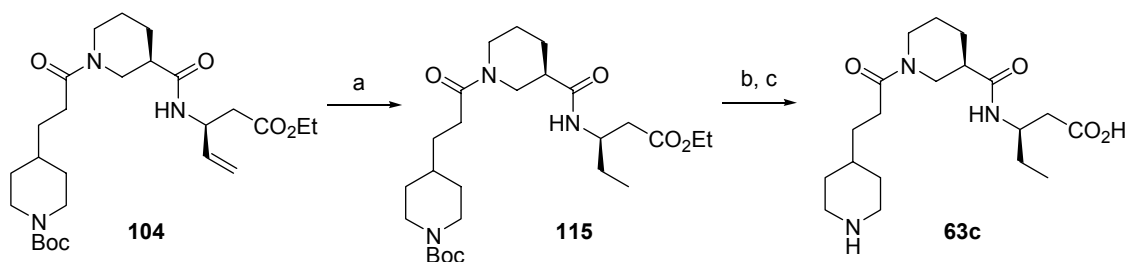
3. 2. 2. にて合成した各種  $\beta$ -アミノ酸誘導体 **65**, **84-89**, **93**, **96** は、それぞれ、EDC, HOBT 存在下で **49** と縮合した後、エステル基及び Boc 基を脱保護し、目的物 **63a, b**, および **63d-k** に誘導した (Scheme 18)。なお、 $\beta$  位にフェニル基が置換されたラセミ  $\beta$ -アミノ酸エステル **65** から誘導した **63a, b** のエピマー混合物は、HPLC を用いた分取精製を経て、それぞれのエピマーを分離した (**63a** が高極性誘導体、**63b** が低極性誘導体)。**63a, b** (R = Ph) のカルボン酸  $\beta$  位の絶対配置は、標品の光学活性 (*S*)-3-アミノ-3-フェニルプロパン酸エチルを用いて Scheme 18 と同様の方法で合成した  $\beta$  位が (*S*)体である標品との HPLC を比較することにより、化合物 **63a** が (*S*)体、**63b** が (*R*)体であると決定した。

また、カルボン酸  $\beta$  位にエチル基が置換された誘導体 **63c** はビニル誘導体 **104** を酸化白金触媒存在下で水素添加還元し **115** に変換した後、保護基の脱保護を行い合成した (Scheme 19)。



Compd	R (Stereo)	Compd	R (Stereo)	Compd	R (Stereo)
<b>65, 97, 106</b>	Ph ( <i>R,S</i> mix)				
<b>63a</b>	Ph ( <i>S</i> )	<b>86, 100, 109, 63f</b>	 ( <i>R</i> )	<b>89, 103, 112, 63i</b>	 ( <i>R</i> )
<b>63b</b>	Ph ( <i>R</i> )				
<b>84, 98, 107, 63d</b>	 ( <i>R</i> )	<b>87, 101, 110, 63g</b>	 ( <i>R</i> )	<b>93, 104, 113, 63j</b>	 ( <i>S</i> )
<b>85, 99, 108, 63e</b>	 ( <i>R</i> )	<b>88, 102, 111, 63h</b>	 ( <i>R</i> )	<b>96, 105, 114, 63k</b>	 ( <i>S</i> )

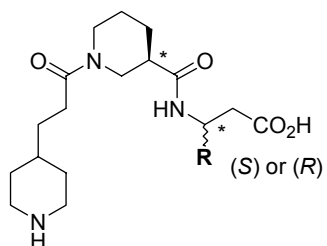
**Scheme 18.** Reagents: (a) EDC HCl, HOBT, Et<sub>3</sub>N, DMF, 83% for **97**, 100% for **98**, 92% for **99**, 88% for **100**, 90% for **101**; 100% for **102**, 62% for **103**, 100% for **104**, 100% for **105**; (b) LiOH, ROH, THF, 86% for **106**, 97% for **107**, 85% for **108**, 72% for **109**, 72% for **110**; 87% for **111**, 86% for **112**, 100% for **113**, 100% for **114**; (c) HCl, AcOEt, 34% for **63a**, 43% for **63b**, 77% for **63d**, 93% for **63e**, 84% for **63f**, 100% for **63g**, 100% for **63h**, 90% for **63i**, 100% for **63j**, 70% for **63k**.



**Scheme 19.** Reagents: (a) cat.PtO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>, 91% (b) LiOH, EtOH, THF; (c) HCl, AcOEt, 90% in 2 steps.

### 3. 4. 経口剤候補化合物の血小板凝集活性と経口吸収性の測定

前項に示した方法により得られたβ位置換誘導体 **63a-k** の血小板凝集抑制作用 IC<sub>50</sub> 値を前章と同様の方法で測定した。同時に、経口吸収性を簡易的に測定するため、以下の実験を行った。絶食ラットに 1.0 mg/kg の投与量で測定薬剤を経口投与し、投与 1 時間後及び 3 時間後に採血を行い、その血漿成分を分離した。それぞれの血漿サンプルに血小板凝集誘発剤である ADP を添加した。経口吸収性の良い薬剤の場合には、薬剤は消化管を通じて吸収され、血漿中に存在する。このため ADP 誘発血小板凝集は抑えられる。逆に経口吸収性の悪い薬剤では、血漿中に薬剤は少量しか存在しないため、ADP 誘発血小板凝集は殆ど抑えられない。従って、これらの凝集抑制率を観測することにより、簡易的に薬剤がどれだけ吸収されたかを推測できる (*ex vivo* assay 法)。血小板凝集抑制 IC<sub>50</sub> 値と、経口吸収性を示す *ex vivo* 実験結果を Table 10 に示す。β位にフェニル基を直接導入した誘導体 **63a** の血小板凝集抑制 IC<sub>50</sub> 値は 91 nM で、プロトタイプ化合物である無置換誘導体 **50** のほぼ 2 倍の活性を示した。しかし、**63a** の経口吸収性は *ex vivo* データが示すように、プロトタイプ化合物 **50** よりも低減した。**63a** のエピマーである **63b** は殆ど活性を示さなかった。前章で述べたカルボン酸α位変換研究の場合では、エピマー間でこれほど活性に差が見られなかった。この対照的な結果から、**63b** のカルボン酸β位付近には、立体的または電子的に何らかの反



**Table 10.**

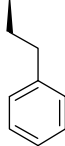
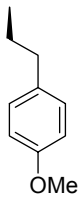
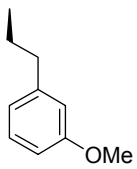
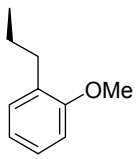
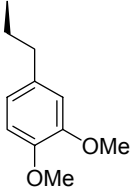
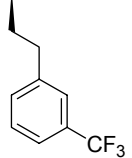


Compd	R	Stereo	IC <sub>50</sub> (ADP induced aggregation), nM <sup>a</sup>	<i>ex vivo</i> assay		CLOGP
				Orally activity in Rat inhibition, %		
				1h	3h	
<b>50</b>	H	-	190	55	29	-2.834
<b>63a</b>	Ph	(S)	91	9	17	-0.801
<b>63b</b>	Ph	(R)	>1000	NT	NT	-0.801
<b>63c</b>	Et	(R)	300	NT	NT	-1.546
<b>63d</b>		(R)	190	49	46	-0.128
<b>63e</b>		(R)	110	0	26	-0.209
<b>63f</b>		(R)	65	12	13	-0.209
<b>63g</b>		(R)	390	NT	NT	-0.209



Table 10. (continued)

Compd	R	Stereo	IC <sub>50</sub> (ADP-induced aggregation), nM <sup>a</sup>	ex vivo assay		CLOGP
				Orally activity in Rat inhibition, %		
				1h	3h	
63h		(R)	27	4	11	-0.470
63i		(R)	625	NT	NT	+0.755
63j		(S)	160	NT	NT	-1.830
63k		(S)	33	71	46	-1.654

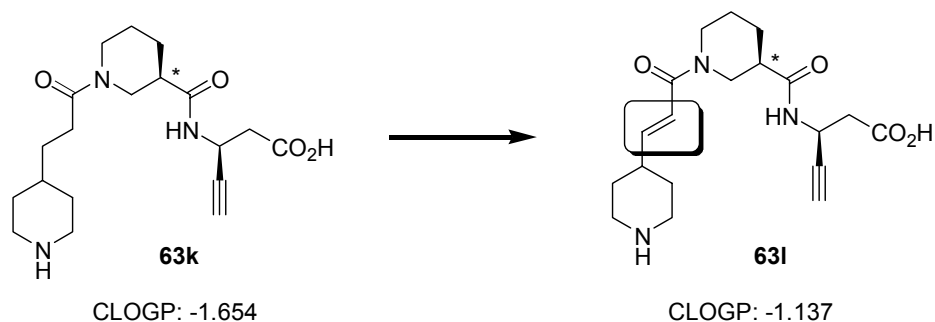
<sup>a</sup> Concentration required to reduce binding ADP-induced human platelet aggregation response by 50%

発を起こす GPIIb/IIIa 蛋白の一部が接近していることが示唆される。芳香環から脂肪鎖に変換した  $\beta$ -エチル誘導体 **63c** については血小板凝集抑制能が低減した。このことから、カルボン酸  $\beta$  位付近には、電子過剰な置換基が必須であると考えられた。すなわち、カルボン酸  $\beta$  位付近で GPIIb/IIIa 蛋白と電子的相互作用が存在するのではないかと示唆される。次に、 $\beta$  位置換基を  $\beta$ -フェニルエチル基として、その立体配置を **63a** と同じ向きに固定した。その結果 **63d** は、プロトタイプ化合物 **50** と同程度の血小板凝集抑制作用を示し、また経口吸収性も **50** とほぼ同等であることが分かった。更なる血小板凝集抑制活性向上と経口吸収性の改善を目的とし、**63d** の芳香環上の置換基効果を検討した。メトキシ基を芳香環上に導入した化合物 **63e-g** では、メタ置換体 **63f** において血小板凝集抑制活性の向上 (IC<sub>50</sub>; 65 nM) が見られた。パラ置換誘導体 **63e** においてもやや活性の向上が見られたが、オルト置換体 **63g** では活性が低下した。これらの知見を基に、パラ、メタ-ジメトキシ置換体 **63h** の評価を行

った。その結果、血小板凝集抑制活性  $IC_{50}$  が 27 nM と、これまでの研究で最強の活性を有する化合物であることが分かった。しかしながら、これらメトキシ置換芳香環誘導体 **63e-h** は何れも経口吸収性が極端に低下することが *ex vivo* データより明らかとなった。この原因として、分子全体の脂溶性は向上したものの、 $\beta$ 位の置換基が大きくなりすぎたため、腸間膜を通過しにくくなったためと考えられる。なお、芳香環上の置換基を電子吸引性置換基であるトリフルオロメチル基に変換した誘導体 **63i** では血小板凝集抑制活性の大幅な低減が見られた。以上の結果より、カルボン酸  $\beta$ 位の芳香環誘導体では、血小板凝集抑制活性の向上と経口吸収性の2つを同時に実現できる誘導体を見出すことはできないと判断した。そこで、分子サイズが小さく、且つ芳香環に代わる電子過剰な置換基として、オレフィン、アセチレン基をカルボン酸  $\beta$ 位に有する誘導体 **63j**, **63k** の評価を行った。その結果、ビニル誘導体 **63j** の血小板凝集抑制活性はプロトタイプ化合物 **50** と同等であったが、エチニル誘導体 **63k** では血小板凝集抑制活性に大幅な向上が認められた ( $IC_{50}$ ; 33 nM)。また、**63k** の経口吸収性の測定結果 (*ex vivo* 実験) から、経口投与1時間後で71%凝集抑制、3時間後においても46%凝集抑制を保持しており、経口吸収性の良い誘導体であることが期待された。そこで、**63k** を用いてラット及びイヌにおける詳細なBAを測定した。

### 3. 5. $\beta$ -エチニル誘導体の生物学的利用率 (BA)

化合物 **63k** を用いてラット、及びイヌにおける生物学的利用率 (BA) を 3.1.1. に示した方法により測定した。その結果、ラットにおけるBAは7.6%、イヌにおけるBAは6.3%と、ともに低いBA値に留まることが判明した。吸収性を向上させるには、更なる脂溶性の向上が



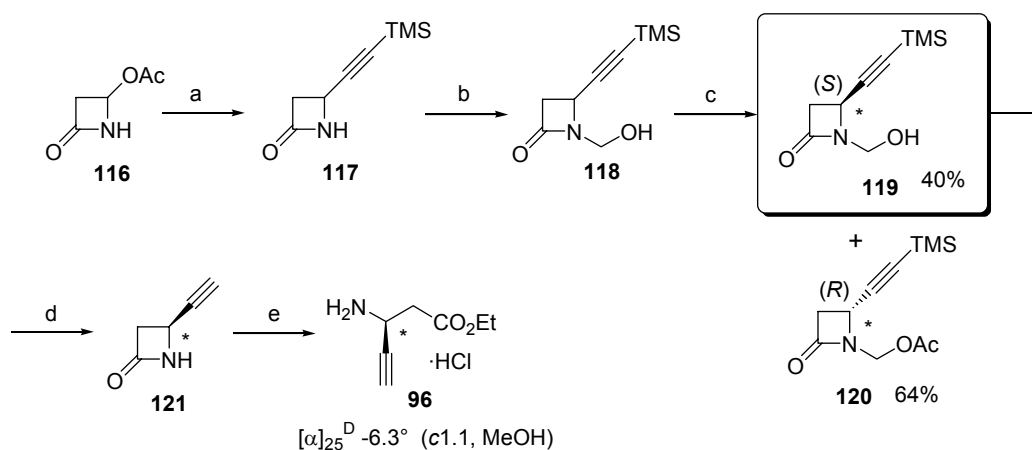
**Figure 19.** Incorporation of double bond at R' Part of **63k**.

望まれた。そこで、**63k** のコンフォメーションの固定を目的とし、G'部分のピペリジンを繋げるメチレン鎖に2重結合を導入した化合物 **63l** の合成を計画した (Figure 19)。**63l** の脂溶性を示す CLOGP 値は -1.137 で、**63k** の CLOGP 値-1.654 と比較し、より脂溶性に富むと考えられ、吸収性の向上が期待できた。

### 3. 6. プロトタイプ化合物への不飽和結合を導入した誘導体の合成

#### 3. 6. 1. 光学活性 $\beta$ -アルキニル $\beta$ -アミノ酸誘導体の新規合成法の確立<sup>47)</sup>

**63l** およびその周辺化合物の各種動物での経口吸収性を測定するため、大量の目的物 **63l** を合成が必要であった。ここで問題となるのは **63l** の D'部分である (S)-2-アルキニル  $\beta$ -アミノ酸誘導体 **96** の大量入手法であった。少量の **96** は Scheme 17 に示した L-アスパラギン酸から誘導できた。しかし、各段階の収率が低く、また後処理が煩雑で、各段階で精密なカラム精製が必要とするなど、大量合成には不向きであった。著者は、これらの問題を払拭した新たな  $\beta$ -アミノ酸 **96** の大量合成法の確立を行った。合成経路を Scheme 20 に示す。出発原料として入手容易な 4-アセトキシアゼチジノン (**116**)を用いた。この化合物に塩化エチルマグネシウムとトリメチルシリルアセチレンから反応系中で発生させた 5 当量の塩化



**Scheme 20.** Reagents:(a) trimethylsilylacetylene, EtMgCl, -40-0 °C, 100%; (b) paraformaldehyde, neat, 75%;(c) Lipase PS<sup>®</sup>, vinyl acetate, then SiO<sub>2</sub> column chromatography (see table 12);(d) NH<sub>4</sub>OH, MeOH, 61%; (e) HCl, MeOH, 94%.

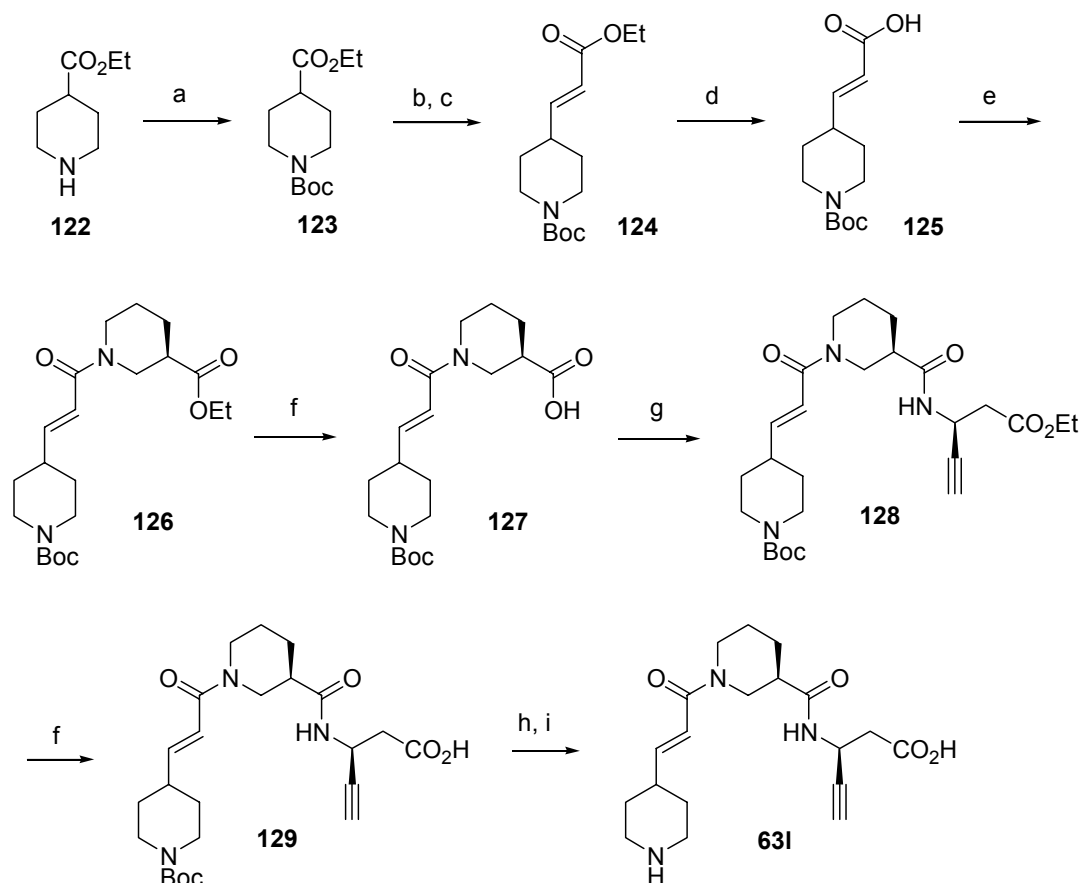
エチルマグネシウムを反応させる (-30 °C–10 °C) と、アゼチジノン 4 位がエチル基で置換された化合物 **117** をほぼ定量的に得ることができた。無溶媒で **117** とパラホルムアルデヒドを 135 °C で加熱することにより、窒素原子がヒドロキシメチル化された **118** を 75% 収率で得た。この **118** を、寺尾、阿知波らにより報告されたリパーゼ触媒を用いた速度論的光学分割反応に付した<sup>48)</sup>。すなわち、アセチル化剤である酢酸ビニルの存在下、37 °C でリパーゼ PS<sup>®</sup>,<sup>49)</sup> と、ラセミ基質 **118** を攪拌すると、(*R*)体のみが選択的にアセチル化を受け、**120** を生成する。他方、(*S*)体は反応が進行せずヒドロキシエチル体 **119** として回収される。この速度論的光学分割反応の条件の検討を行った結果 (Table 11)、反応溶媒により反応速度及び光学分割能が大きく変化した。その中で、塩化メチレン/ジイソプロピルエーテル=1:2 の混合溶媒が反応性と光学分割能のバランスが最も良い結果となった (entry 2)。この酵素による基質 **118** のエナンチオマー区別性は、最適条件においても完全ではなかったため、転化率を 60% まで進めた時点で反応を終了させた。リパーゼをろ過により取り除き、ろ液を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにて **119** と **120** を分離した。目的物である **119** のヒドロキシメチル基とトリメチルシリル基の両保護基を同時にアンモニア水で切断し、**121** を得た。続いて、塩酸ガスを吹き込んだエタノール中で **121** の  $\beta$ -ラクタム環を開環させ、目的物である **96** に誘導した。**96** の絶対配置が (*S*)体であることは、Scheme 17 に示した方法で合成した化合物 **96** との旋光度の比較により決定した。また、光学純度は HPLC 分析により 98% ee であることを確認した。この光学分割反応はスケールアップを行っても再現性良く反応が進行し、700 g の原料 **118** を用いても行うことができることが分かった。

**Table 11.** Optimization of the kinetic resolution reaction of **118**.

Entry	solvent (30 v/w)	T <sub>50</sub> <sup>a)</sup> , h	Reaction time, h	Recovery of <b>119</b> <sup>b)</sup> , %	% ee of <b>119</b> <sup>c)</sup>
1	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	12	24	40	91
2	IPE-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2 : 1)	4	9	40	97
3	IPE-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (2 : 1)	4	24	30	>99
4	1,4-Dioxane	10	24	50	92

a) the time the reaction conversion was proceeded to 50%; b) Isolated yield after purified by column chromatography; c) **119** was converted to **96** and determined by HPLC analysis of **96** (CROWNPAK CR).

### 3. 6. 2. $\beta$ -エチニル置換誘導体の合成



**Scheme 21.** Reagents: (a)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ , 100%; (b) DIBAL,  $-75\text{ }^\circ\text{C}$ ; (c)  $(\text{EtO})_2\text{POCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$ , NaH, 86% in 2 steps; (d) NaOH, 88%; (e) **47**,  $\text{Et}_3\text{N}$ , EDC HCl, HOBT, DMF, 96%; (f) LiOH, 74% for **127**, 97% for **129**; (g) **96**,  $\text{Et}_3\text{N}$ , EDC HCl, HOBT, DMF, 74%; (h) HCl, EtOAc; (i) Diaion HP20<sup>®</sup> 100% in 2 steps.

市販のイソニペコチン酸エチル (**122**) から目的とする不飽和誘導体 **631** への合成経路を Scheme 21 に示す。窒素原子を Boc 保護したイソニペコチン酸エチル **123** を 1 当量の水素化ジイソブチルアルミニウム (DIBAL) と作用させてアルデヒド体に変換した後、Horner-Emmons タイプの Wittig 反応により  $\alpha, \beta$ -不飽和エステル **124** に誘導した。**124** の *E/Z* 比は  $^1\text{H NMR}$  により 96 : 4 であった。これら異性体はカラムクロマトグラフィーによって分離可能である。あるいは *E,Z* 混合物のアルカリ加水分解を行い、カルボン酸 **125** に変換した後、ヘキサン-ジイソプロピルエーテルを用いて再結晶を行い、*E* 体の **125** のみ得ることができた。この **125** はこれまでに示した同様の方法で、光学活性アミン **47** と、続いて **96**

と順次縮合を行った後、エステル加水分解を経て **129** を得た。最後に Boc 基の脱保護により、不飽和誘導体 **63I** を得る事に成功した。

### 3. 7. 不飽和誘導体の血小板凝集抑制作用と経口吸収性

先の項で述べた方法で合成した不飽和誘導体 **63I** の血小板凝集抑制活性  $IC_{50}$  値とイヌにおける経口吸収性の測定を行った。結果を Table 12 に示す。**63I** の血小板凝集抑制活性  $IC_{50}$  は 38

**Table 12.**  $IC_{50}$  values and pharmacokinetic parameters in fasted animal of **63k** and **63I**

Compd	$IC_{50}$ (nM)	species (匹数; n = 3)	i.v.(静脈内注射) (3.2 mg/kg)		p.o.(経口投与) (10 mg/kg)			BA, %
			AUC (0- $\infty$ ), $\mu\text{g h/ml}$	T1/2 $\beta$ , h	AUC (0-24 h), $\mu\text{g h/ml}$	C max, $\mu\text{g/ml}$	T max, h	
<b>63k</b>	33	dog	16.185 $\pm$ 0.735	2.35 $\pm$ 0.20	3.164 $\pm$ 0.313	0.608 $\pm$ 0.048	1.0 $\pm$ 0.5	6.3 $\pm$ 0.5
<b>63I</b>	38	dog	12.007 $\pm$ 0.530	2.162 $\pm$ 0.657	5.535 $\pm$ 1.760	1.266 $\pm$ 0.403	1.33 $\pm$ 0.33	14.8 $\pm$ 4.7
<b>63I</b>		monkey	17.126 $\pm$ 1.917	1.135 $\pm$ 0.151	3.490 $\pm$ 1.040	0.328 $\pm$ 0.004	4.00 $\pm$ 0.00	6.45 $\pm$ 0.05

nM の値を示し、飽和誘導体 **63k** とほぼ同じ強い抑制活性を保持することが分かった。**63I** の経口吸収性を示すパラメータを精査すると、経口投与時の AUC 値が、**63k** に比べやや改善し、その結果 BA 値が 14.8% と飽和誘導体 **63k** より 2 倍以上経口吸収性が向上することが分かった。しかし、測定動物種をヒトに近いと考えられるサルを用いて経口吸収性を測定したところ、BA 値は 6.45% と低い値に留まることが判明した。こうした事実から、水溶性に富む活性原体の消化管からの吸収は困難であると判断し、次にプロドラッグ体の検討を行った。

### 3. 8. 不飽和誘導体の経口吸収性の改善

#### 3. 8. 1. プロドラッグ化の検討

プロドラッグとは、それ自身は薬理的に不活性であるが、薬物の標的部位またはその近傍で酵素や化学的作用により活性化される薬物のことである。Figure 19 に示す化合物 **63I** の活性部位であるカルボン酸またはアミノ基を化学修飾し、その脂溶性を向上させれば、腸管壁からの薬剤吸収が向上するのではないかと考えた。さらに吸収の過程で腸管壁内の酵素の働きにより、活性体に戻ることができれば、血液中での高い薬物濃度が実現できると期待される。修飾法としては、Figure 19 に示すように、化学アミノ基部分をウレタン化する方法 (誘導体 **130** の合成)、及びカルボン酸部分をエステル化する方法 (誘導体 **131** の合成)の2通りが考えられた。この2種の誘導体の中でエステル変換体 (誘導体 **131**)が腸管壁内のエステラーゼにより容易に加水分解を起こし、より容易に活性体に戻ることが予想されたので、カルボン酸部分のエステルへの変換検討を行った。

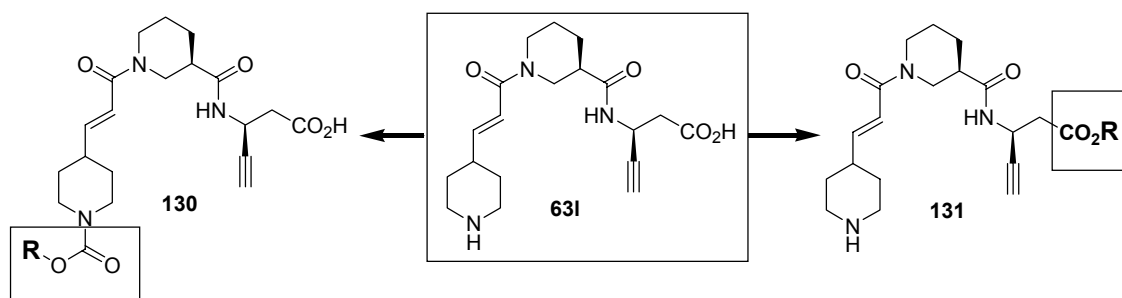
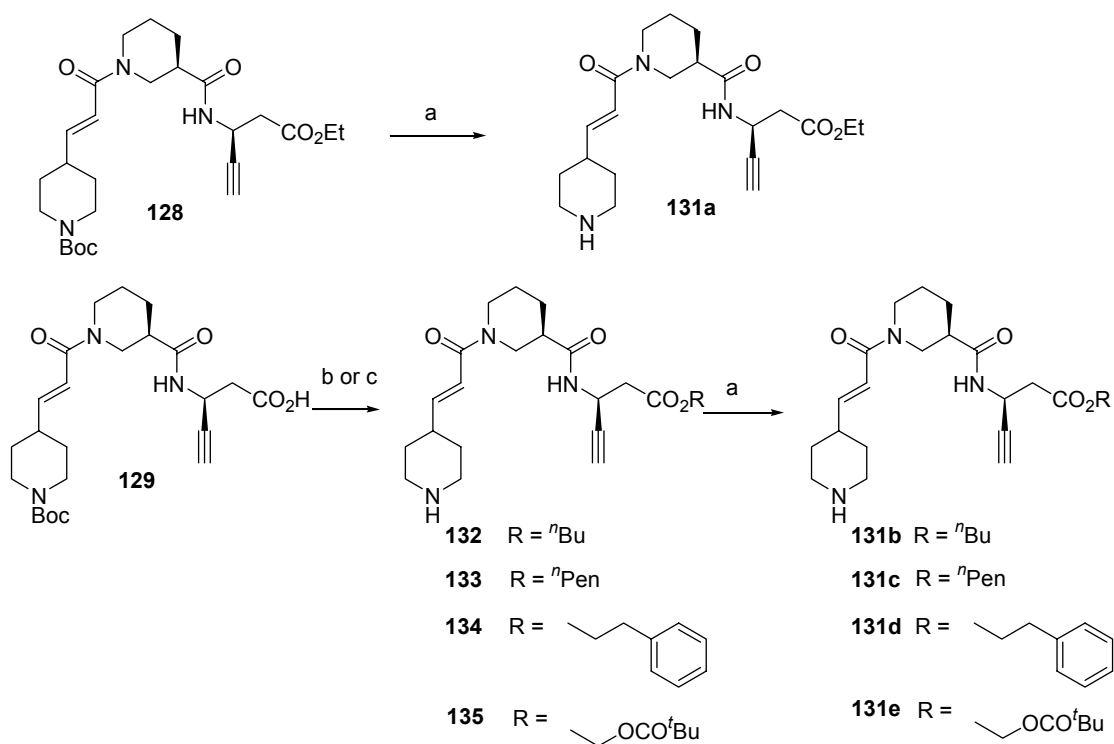


Figure 19. The strategy for the conversion of **63I** to prodrug.

#### 3. 8. 2. プロドラッグ体の合成

プロドラッグ体の合成経路を Scheme 22 に示す。プロドラッグとなるエチルエステル体 **131a** は、**63k** 合成における中間体 **128** を脱 Boc 化して合成した。その他の種々のエステル体合成には、合成中間体 **129** を出発原料として用いた。EDC、HOBT、4-ジメチルアミノピ

リジン (DMAP)存在下で、各種のアルコールを用いてエステル化を行い、続いて脱 Boc 化により、ブチルエステル体 **131b**、ペンチルエステル体 **131c**、 $\beta$ -フェネチルエステル体 **131d** を合成した。また、ピバロイルメチレンエステル体 **131e** の合成では、ピバロイルヨウ化メチルと炭酸カリウム存在下でエステル化を行い、続いて脱 Boc 化を行った。



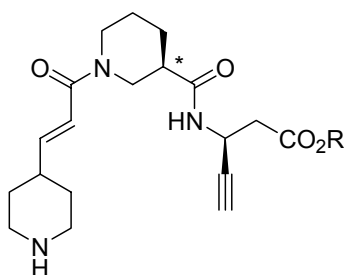
**Scheme 22.** Reagents: (a) HCl, EtOAc, 84% for **131a**, 100% for **131b**, 32% for **131c**, 83% for **131d**, 81% for **131e** (b) DMAP, EDC, HOBT, DMF, 89% for **132**, 94% for **133**, 100% for **134**; (c)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{ICH}_2\text{OCOC}^t\text{Bu}$ , 59% for **135**.

### 3. 8. 3. プロドラッグ体の経口吸収性

各種プロドラッグ体 **131a-e** をラットに 1.0 mg/kg の割合で経口投与し、3 時間及び 8 時間後に採血を行い、血漿を分離して、先と同様に *ex vivo* 実験を行った。結果を Table 13 に示す。アルキルエステルの直鎖を、エチル基 (**131a**)からブチル基 (**131b**)、ペンチル基 (**131c**)へと伸ばした場合、ペンチルエステル誘導体 **131c** で明らかな経口吸収性の向上が見られた。更



なる脂溶性の向上を目的として合成した  $\beta$ -フェネチルエステル誘導体 **131d** では、逆に経口吸収性が低下した。また、より消化管酵素で切断されやすいと考えられたピバロイルメチルエステルは吸収性の向上があまり見られない結果となった。このことは、消化管で切断される以前に吸収されにくいためであると考えている。以上の結果から、最も経口吸収性が高いと考えられるペンチルエステル体 **131c** をサルに経口投与し、その BA を測定した。



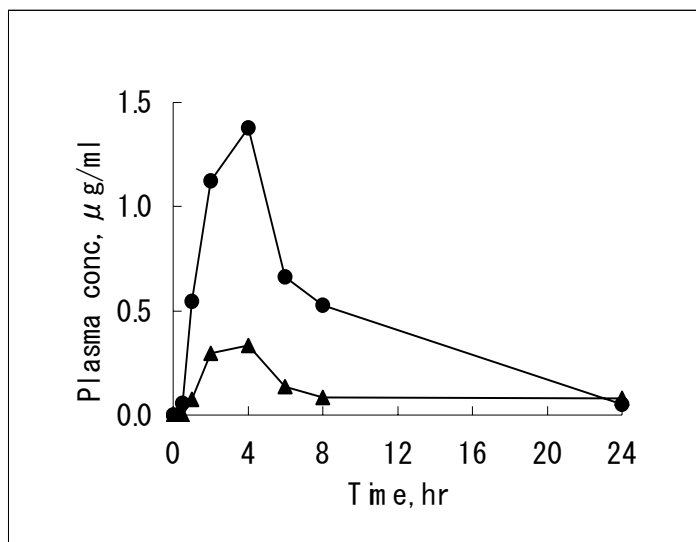
**Table 13.** Orally-activity of prodrug

Compd	R	CLOGP	ex vivo assay Orally activity in Rat inhibition, % 1.0 mg/kg p.o.	
			3h	8h
<b>131a</b>		2.137	42	47
<b>131b</b>		3.195	35	44
<b>131c</b>		3.724	56	49
<b>131d</b>		3.705	22	18
<b>131e</b>		2.952	37	38

#### 3. 8. 4. 最適プロドラッグ化合物の経口吸収率

絶食サルに力価 10 mg/kg (カルボン酸 **63l** 換算)の投与量で **131c** を経口投与し、その血中濃度推移をグラフにプロットした。比較対照のため、活性原体である **63l** の同用量での経口投与時の血中濃度推移も同時にプロットした (Figure 20)。その結果、プロドラッグ体への変

換により、薬物の血中濃度が飛躍的に向上することが分かった。また各種薬物動態プロファイルを示す Table 14 に示す。これらの値から算出したプロドラッグ体 **131c** の BA は 25.8%と、活性原体 **63l** の約 4 倍向上することを見出した。



**Figure 20.** Plasma concentration of **63l** in monkey (サルにおける **63l** の血漿中濃度推移)  
(p.o. administration of **63l** ▲ and **131c** ● (10mg/kg)(**63l** 及び **131c** の 10mg/kg 経口投与時))

**Table 14.** Pharmacokinetic parameters in fasted monkey of **131c** and **63l**  
(絶食サルにおける **131c** 及び **63l** の薬物動態パラメータ) 測定匹数 n = 3

Compd	i.v.(静脈内注射) (3.2 mg/kg)		p.o.(経口投与) (10 mg/kg)		BA, %
	AUC (0-∞), μg h/ml	T <sub>1/2β</sub> , h	AUC (0-24 h), μg h/ml	C max, μg/ml T max, h	
<b>131c</b>	-	-	10.067 ± 1.284	1.198 ± 0.182 5.00 ± 1.00	25.8 ± 8.1
<b>63l</b>	17.126 ± 1.917	1.135 ± 0.151	3.490 ± 1.040	0.328 ± 0.004 4.00 ± 0.00	6.45 ± 0.05

### 3. 9. 小括

以上、著者はプロトタイプ化合物 **50** のカルボン酸  $\beta$  位にエチニル置換基を導入し、優れた血小板凝集抑制能を有する化合物 **63k** を見出した<sup>50)</sup>。経口吸収性の向上を目的とし、主鎖に炭素-炭素 2 重結合を導入し (**63l**)、更にカルボン酸部分をエステル体にしたプロドラッグへと変換した。その結果、経口吸収性に優れたプロドラッグ体 **131c** の創出に成功した。今後、より経口吸収性を向上させるため、製剤法などの検討などを重ねた後、注射剤 **61e** に続いて臨床開発試験段階に入るものと期待される。

### 3. 10. 実験の部

#### 3. 10. 1. Chemistry

**Methyl 3-amino-3-phenyl propanoate hydrochloride (65).** Thionyl chloride (1.27 ml, 17.4 mmol) was added dropwise to MeOH (5.0 ml) at  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After stirring for 10 min at the same temperature, 3-amino-3-phenyl propanoic acid hydrochloride (**64**) was added to the solution, and stirring was continued for 3 h at room temperature. Volatiles were evaporated in vacuo, and the residual solid was triturated with Et<sub>2</sub>O, collected on a glass filter, washed with Et<sub>2</sub>O, and dried in vacuo to give **65** (870 mg, 81%) as a solid: IR (neat) 1725, 1600, 1210, 995, 895, 770  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3.02 (dd, *J* = 16.2, 8.9 Hz, 1H), 3.27 (dd, *J* = 16.2, 5.7 Hz, 1H), 3.54 (s, 3H), 4.57 (dd, *J* = 8.9, 5.7 Hz, 1H), 7.33-7.46 (m, 3H), 7.55-7.60 (m, 2H), 8.57 (s, 2H); MS (APCI) *m/z* 180 (M+H)<sup>+</sup>.

**Ethyl (2E)-5-phenyl-2-pentenoate (72).** To a suspension of sodium hydride (60% dispersion in mineral oil, 3.28 g, 82.0 mmol) in THF (35 ml) was added dropwise triethyl phosphonoacetate (16.3 ml, 82.0 mmol) in THF (50 ml) over a period of 0.5 h under ice cooling. The mixture was stirred for 0.5 h at the same temperature. To the reaction mixture was added 3-phenylpropanal (**66**) (10.0 g, 74.5 mmol) in THF (60 ml) over a period of 20 min at room temperature and the mixture was stirred for 1 h at room temperature. The resulting mixture was poured into iced water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with hexane/EtOAc (100:2.5) to give **72** (8.91 g, 59%) as an oil: IR (neat) 2980, 2920, 1710, 1650, 1040  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.28 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 2.47-2.58 (m, 2H), 2.74-2.92 (m, 2H), 4.18 (q, *J* =

7.1 Hz, 2H), 5.84 (dt,  $J = 15.6, 1.5$  Hz, 1H), 7.00 (dt,  $J = 16.4, 6.7$  Hz, 1H), 7.16-7.35 (m, 5H); MS (APCI)  $m/z$  205 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (2E)-5-(4-methoxyphenyl)-2-pentenoate (73).** To a solution of oxalyl chloride (3.67 ml, 42.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35 ml) was added dropwise dimethylsulfoxide (3.66 ml, 51.1 mmol) at -70 °C. To this was added a solution of 3-(4-methoxyphenyl)-1-propanol (**73**) (5.00 g, 30.1 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (9 ml) dropwise, and then added triethylamine (14.3 ml, 102 mmol), and the mixture was allowed to warm to room temperature, stirred for further 1 h at the same temperature. To the resulting mixture was added methyl (triphenylphosphoranylidene)acetate (12.1 g, 36.1 mmol) and the mixture was stirred for 2 h at room temperature. The resulting mixture was poured into water and extracted with Et<sub>2</sub>O. The organic layer was washed with 10% KHSO<sub>4</sub>, water, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with hexane/Et<sub>2</sub>O (10:1) to give **73** (5.55 g, 84%) as an oil: IR (neat) 3000, 2940, 2840, 1710, 1605, 1505, 1435, 1240, 1035 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.43-2.54 (m, 2H), 2.72 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 5.83 (dt,  $J = 15.7, 1.5$  Hz, 1H), 6.79-7.13 (m, 5H); MS (APCI)  $m/z$  221 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (2E)-5-(3-methoxyphenyl)-2-pentenoate (74).** This compound was prepared from **68** using a procedure similar to that employed for the preparation of **73** (82%): IR (neat) 2948, 1718, 1657, 1603, 1585, 1489, 1456, 1319, 1263, 1201, 1153, 1043, 781, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.46-2.58 (m, 2H), 2.71-2.79 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 5.85 (dt,  $J = 15.8, 1.5$  Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.73-6.79 (m, 2H), 7.00 (dt,  $J = 15.8, 6.7$  Hz, 1H), 7.17-7.25 (m, 1H), 7.21 (dd,  $J = 8.5, 7.5$  Hz, 1H); MS (ESI)  $m/z$  243.3 (M+Na)<sup>+</sup>.

**Methyl (2E)-5-(2-methoxyphenyl)-2-pentenoate (75).** This compound was prepared from **69** using a procedure similar to that employed for the preparation of **73** (70%): IR (neat) 3000, 2950, 2840, 1720, 1635, 1510, 1030, 770  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.43-2.54 (m, 2H), 2.77 (t,  $J = 7.8$  Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 5.83 (dt,  $J = 15.7, 1.5$  Hz, 1H), 6.83-7.26 (m, 5H); MS (APCI)  $m/z$  221 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Methyl (2E)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-pentenoate (76).** This compound was prepared from **70** using a procedure similar to that employed for the preparation of **73** (87%): IR (neat) 3000, 2940, 2840, 1720, 1650, 1490, 1240, 1030, 750  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.45-2.59 (m, 2H), 2.73 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 5.84 (dt,  $J = 15.7, 1.5$  Hz, 1H), 6.69-6.82 (m, 3H), 7.00 (dt,  $J = 15.7, 6.7$  Hz, 1H); MS (APCI)  $m/z$  251 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Methyl (2E)-5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-2-pentenoate (77).** This compound was prepared from **71** using a procedure similar to that employed for the preparation of **73** (73%): IR (neat) 3000, 2940, 2850, 1710, 1650, 1435, 1325, 1070, 800, 700  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.49-2.60 (m, 2H), 2.85 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H), 3.73 (s, 3H), 5.85 (dt,  $J = 15.6, 1.5$  Hz, 1H), 6.98 (dt,  $J = 15.6, 6.8$  Hz, 1H), 7.73-7.50 (m, 4H); MS (APCI)  $m/z$  259 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Ethyl (3R)-3-{benzyl[(1R)-1-phenylethyl]amino}-5-phenylpentanoate (78).** To a solution of (*R*)-*N*-benzyl- $\alpha$ -methylbenzylamine (2.00 ml, 9.46 mmol) in THF (40 ml) was added dropwise *n*-BuLi (5.88 ml, 9.46 mmol) at 0  $^\circ\text{C}$ . This mixture was stirred at 0  $^\circ\text{C}$  for 15 min. After cooling to  $-70$   $^\circ\text{C}$ , to this was added a solution of **72** (970 mg, 4.73 mmol) in THF (30 ml) dropwise and the mixture was stirred for 1 h at the same temperature. To the resulting mixture was added saturated

aqueous  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution to quench the reaction and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The organic layer was washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with hexane/ $\text{EtOAc}$  (97:3) to give **78** (1.41 g, 72%) as an oil. The diastereomer excess was 93% de determined by  $^1\text{H}$  NMR analysis: IR (neat) 3030, 2980, 2930, 1725, 1600, 1495, 1450, 1360, 1030, 745, 700  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.16 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.35 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.59-1.67 (m, 1H), 1.74-1.84 (m, 1H), 2.04-2.06 (m, 2H), 2.58 (ddd,  $J = 13.5, 10.6, 5.7$  Hz, 1H), 2.97 (ddd,  $J = 13.5, 10.6, 5.1$  Hz, 1H), 3.38-3.45 (m, 1H), 3.59 (d,  $J = 14.6$  Hz, 1H), 3.82 (d,  $J = 14.6$  Hz, 1H), 3.88 (q,  $J = 7.1$  Hz, 1H), 3.91-4.06 (m, 2H), 7.12-7.18 (m, 3H), 7.21-7.31 (m, 8H), 7.34-7.40 (m, 2H), 7.46-7.48 (m, 2H); MS (APCI)  $m/z$  416 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Methyl (3R)-3-{benzyl[(1R)-1-phenylethyl]amino}-5-(4-methoxyphenyl)pentanoate (79).** This compound was prepared from **73** using a procedure similar to that employed for the preparation of **78** (97%): IR (neat) 3020, 2925, 2840, 1720, 1605, 1490, 1450, 1240, 1030, 820, 745, 695  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.35 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.50-1.80 (m, 1H), 2.07 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.45-2.60 (m, 1H), 2.82-2.97 (m, 1H), 3.33-3.46 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.56-3.91 (m, 2H), 3.64 (s, 3H), 6.78-6.84 (m, 2H), 7.01-7.08 (m, 2H), 7.19-7.48 (m, 10H); MS (APCI)  $m/z$  432 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Methyl (3R)-3-{benzyl[(1R)-1-phenylethyl]amino}-5-(3-methoxyphenyl)pentanoate (80).** This compound was prepared from **74** using a procedure similar to that employed for the preparation of **78** (73%): IR (neat) 3026, 2949, 2835, 1734, 1601, 1493, 1454, 1259, 1045, 748, 700  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.35 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.55-1.66 (m, 1H), 1.74-1.84 (m, 1H), 2.10 (d,  $J = 6.6$  Hz, 2H), 2.56 (ddd,  $J = 13.6, 11.0, 5.5$  Hz, 1H), 2.94 (ddd,  $J = 13.6, 10.6, 5.5$  Hz, 1H), 3.37-3.45 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.60 (d,  $J = 14.6$  Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.86 (q,  $J = 7.0$  Hz, 1H), 6.68-6.75 (m, 3H),

7.16-7.38 (m, 8H), 7.50 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H); MS (ESI)  $m/z$  432.2 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (3R)-3-{benzyl[(1R)-1-phenylethyl]amino}-5-(2-methoxyphenyl)pentanoate (81).** This compound was prepared from **75** using a procedure similar to that employed for the preparation of **78** (66%): IR (neat) 3030, 2930, 2840, 1725, 1600, 1485, 1455, 1240, 1025, 750, 695 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.34 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.43-1.61 (m, 1H), 1.79-1.97 (m, 1H), 2.10 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.44-2.62 (m, 1H), 2.95-3.10 (m, 1H), 3.10-3.44 (m, 1H), 3.49 (s, 3H), 3.56-3.65 (m, 1H), 3.76 (s, 3H), 3.77-3.91 (m, 2H), 6.82-6.91 (m, 2H), 7.08-7.39 (m, 10H), 7.50 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H); MS (APCI)  $m/z$  432 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (3R)-3-{benzyl[(1R)-1-phenylethyl]amino}-5-(3,4-dimethoxyphenyl)pentanoate (82).** This compound was prepared from **76** using a procedure similar to that employed for the preparation of **78** (70%): IR (neat) 2940, 2840, 1725, 1590, 1505, 1455, 1260, 1235, 1155, 1015, 750, 700 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.34 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.51-1.86 (m, 2H), 2.09 (d,  $J = 6.5$  Hz, 2H), 2.47-2.61 (m, 1H), 2.83-2.92 (m, 1H), 3.34-3.46 (m, 1H), 3.52 (s, 3H), 3.58-3.70 (m, 1H), 3.78-3.91 (m, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 6.65-6.80 (m, 3H), 7.22-7.49 (m, 10H); MS (APCI)  $m/z$  462 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (3R)-3-{benzyl[(1R)-1-phenylethyl]amino}-5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]pentanoate (83).** This compound was prepared from **77** using a procedure similar to that employed for the preparation of **78** (74%): IR (neat) 3020, 2930, 2850, 1725, 1595, 1490, 1445, 1325, 1200, 1020, 800, 750, 695 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.36 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 1.57-1.86 (m, 2H), 2.08 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.56-2.71 (m, 1H), 2.95-3.10 (m, 1H), 3.33-3.46 (m, 1H), 3.53 (s, 3H), 3.57-3.72 (m, 3H), 7.21-7.48 (m, 10H); MS (APCI)  $m/z$  470 (M+H)<sup>+</sup>.



**Ethyl (3*R*)-3-amino-5-phenylpentanoate (84).** To a solution of **78** (1.40 g, 3.37 mmol) in EtOH (30 ml) was added 10% Pd-C (280 mg), and the mixture was stirred under H<sub>2</sub> atmosphere (1 atm) at room temperature for 4 h. The catalyst was filtered off, and the filtrate was evaporated off to give **84** (620 mg, 83%) as an oil: IR (neat) 2970, 2920, 1720, 1600, 1495, 1450, 1370, 645, 600 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.17 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.48-1.66 (m, 2H), 2.23 (dd, *J* = 15.0, 8.1 Hz, 1H), 2.40 (dd, *J* = 15.0, 5.1 Hz, 1H), 2.57-2.75 (m, 2H), 2.90-3.04 (m, 1H), 4.04 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 7.12-7.31 (m, 5H).

**Methyl (3*R*)-3-amino-5-(4-methoxyphenyl)pentanoate (85).** This compound was prepared from **79** using a procedure similar to that employed for the preparation of **84** (87%): IR (neat) 3360, 2930, 2840, 1720, 1605, 1440, 1245, 1035 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.41-1.65 (m, 2H), 2.23 (dd, *J* = 15.0, 8.3 Hz, 1H), 2.41 (dd, *J* = 15.0, 5.0 Hz, 1H), 2.54-2.63 (m, 2H), 2.88-2.98 (m, 1H), 3.57 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 6.81-6.86 (m, 2H), 7.08-7.12 (m, 2H); MS (APCI) *m/z* 238 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (3*R*)-3-amino-5-(3-methoxyphenyl)pentanoate (86).** This compound was prepared from **80** using a procedure similar to that employed for the preparation of **84** (95%): IR (neat) 2999, 2951, 2837, 1734, 1601, 1583, 1489, 1454, 1437, 1259, 1043, 783, 696 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.60-1.84 (m, 2H), 2.32 (dd, *J* = 15.7, 8.7 Hz, 1H), 2.52 (dd, *J* = 15.7, 4.1 Hz, 1H), 3.16-3.30 (m, 1H), 3.69 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 6.70-6.83 (m, 3H), 7.16-7.25 (m, 1H); MS (ESI) *m/z* 238.3 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (3*R*)-3-amino-5-(2-methoxyphenyl)pentanoate (87).** This compound was prepared from **81** using a procedure similar to that employed for the preparation of **84** (100%): IR (neat) 2930, 2830, 1720, 1595, 1485, 1435, 1340, 1045, 1025, 750 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.48-1.81 (m, 2H), 2.30 (dd, *J* = 15.6, 9.0 Hz, 1H), 2.53 (dd, *J* = 15.6, 3.9 Hz, 1H), 2.61-2.77 (m, 2H), 3.12-3.21 (m, 1H),

4.05 (s, 3H), 4.17 (s, 3H), 6.82-6.92 (m, 2H), 7.19-7.31 (m, 2H); MS (APCI)  $m/z$  238 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (3R)-3-amino-5-(3,4-dimethoxyphenyl)pentanoate (88).** This compound was prepared from **82** using a procedure similar to that employed for the preparation of **84** (75%): IR (neat) 2930, 2830, 2650, 1720, 1585, 1505, 1260, 1230, 1155, 1020  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.40-1.71 (m, 2H), 2.23 (dd,  $J = 15.1, 9.0$  Hz, 1H), 2.38-2.71 (m, 3H), 2.87-3.02 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 6.67-6.86 (m, 3H); MS (APCI)  $m/z$  268 (M+H)<sup>+</sup>.

**Methyl (3R)-3-amino-5-(3-(trifluoromethyl)phenyl)pentanoate (89).** This compound was prepared from **83** using a procedure similar to that employed for the preparation of **84** (45%): IR (neat) 2930, 2870, 1725, 1595, 1445, 1335, 1075, 805, 705  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.40-1.76 (m, 2H), 2.25 (dd,  $J = 15.1, 8.3$  Hz, 1H), 2.39-2.52 (m, 1H), 2.65-2.84 (m, 2H), 2.88-2.98 (m, 1H), 3.58 (s, 3H), 7.52-7.56 (m, 4H); MS (APCI)  $m/z$  276 (M+H)<sup>+</sup>.

**Ethyl (3R)-3-amino-5-phenylpentanoate (90).** To a solution of **84** (221 mg, 2.50 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) were added benzyl chloroformate (0.393 ml, 2.75 mmol), and Et<sub>3</sub>N (0.418 ml, 3.00 mmol) successively under ice cooling, and the mixture was stirred at room temperature for 1 h. To the resulting mixture was added water extracted with EtOAc. The organic layer was washed successively with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution, and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with hexane/EtOAc (4:1) to give the *N*-Cbz protected intermediate (415 mg, 47%) as a solid: IR (KBr) 3330, 2945, 1724, 1691, 1539, 1257, 1053, 756, 727, 698  $\text{cm}^{-1}$ ; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.23 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.78-1.98 (m, 2H), 2.48-2.78 (m, 4H), 3.96-4.10 (m, 1H), 4.12 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 5.11 (s, 2H), 5.29 (d,  $J = 9.1$  Hz, 1H), 7.14-7.20 (m, 3H), 7.25-7.29 (m,

2H), 7.30-7.37 (m, 5H); MS (ESI)  $m/z$  356.11 (M+H)<sup>+</sup>. To a solution of this intermediate (355 mg, 1.00 mmol) in THF (3.5 ml) and EtOH (3.5 ml) was added dropwise 1 N aqueous LiOH solution (3.00 ml, 3.00 mmol) under ice cooling and the mixture stirred for 2 h at room temperature. The resulting mixture was washed with Et<sub>2</sub>O, and the aqueous phase was adjusted to pH 3 with 10% aqueous KHSO<sub>4</sub> solution, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was dissolved with MeOH (3.0 ml). To this solution was added 10% Pd-C (170 mg), and the mixture was stirred under H<sub>2</sub> atmosphere (1 atm) at room temperature for 1 h. The catalyst was filtered off, and washed with water. The filtrate was evaporated off to give **90** (620 mg, 84%) as a solid: IR (KBr) 2952, 2920, 1637, 1556, 1404, 721, 700 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.97-2.02 (m, 2H), 2.49 (dd,  $J = 16.7, 8.4$  Hz, 1H), 2.64 (dd,  $J = 16.7, 4.7$  Hz, 1H), 2.74-2.79 (m, 1H), 7.28-7.42 (m, 5H); MS (ESI)  $m/z$  194.10 (M+H)<sup>+</sup>;  $[\alpha]_D^{24} -26.4^\circ$  ( $c$  0.56, MeOH): *lit*<sup>43</sup>;  $[\alpha]_D^{24} -28.4^\circ$  ( $c$  0.56, MeOH).

**(S)-N-tert-Butyldimethylsilyl-4-vinyl-2-azetidinone (92).** To a mixture of zinc powder (11.9 g, 182 mmol) in THF (215 ml) was added Ti(O<sup>*i*</sup>Pr)<sub>4</sub> (6.0 ml, 20.2 mmol) dropwise at room temperature and the resultant mixture was stirred for 1 h. A solution of CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub> (8.1 ml, 101 mmol) was then added to the mixture and it was stirred for further 30 min at room temperature. To the resultant mixture was added dropwise a solution of **91** (4.3 g, 20.2 mmol) in THF (130 ml) and stirred at room temperature for 2 h. The mixture was poured into a mixture of Et<sub>2</sub>O (500 ml) and 1N HCl (300 ml). The organic layer was washed with water, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo. The residue was purified by a column chromatography on silica gel with EtOAc/hexane (1:10) to give **92** (2.13 g, 50%) as a colorless oil: IR (neat) 2940, 2860, 1730 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.17 (s, 3H), 0.19 (s, 3H), 0.96 (s, 9H), 2.77 (dd,  $J = 2.8, 14.7$  Hz, 1H), 3.30 (dd,  $J = 5.6, 14.7$  Hz, 1H), 3.97-4.06 (m, 1H), 4.95-5.13 (m, 2H), 5.58-5.76 (m, 1H); MS

(APCI)  $m/z$  212 (M+H)<sup>+</sup>;  $[\alpha]_D^{20}$  -15.6° (*c* 1.00, MeOH).

**Ethyl (S)-3-amino-4-pentenoate hydrochloride (93).** To a solution of **92** (1.0 g, 4.7 mmol) in EtOH (5 ml) was added 6N HCl in EtOH (5.0 ml, 30 mmol) at 0 °C. After stirring for 1 h at room temperature, the mixture was evaporated in vacuo and the resultant solid was washed with Et<sub>2</sub>O to give **93** (670 mg, 79%) as a white solid: IR (nujol) 3420, 2100, 1720, 1600 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.19 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 2.70 (dd, *J* = 16.0, 8.4 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 16.0, 5.7 Hz, 1H), 3.93-4.00 (m, 1H), 4.05 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 5.32 (d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 17.4 Hz, 1H), 5.89 (ddd, *J* = 17.4, 10.4, 6.9 Hz, 1H), 8.54 (br, 3H); MS (APCI)  $m/z$  144 (M+H)<sup>+</sup>;  $[\alpha]_D^{20}$  -8.9° (*c* 1.00, MeOH); Anal. Calcd for C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub> ·HCl·0.2EtOH: C, 47.11; H, 8.01; N, 7.42. Found: C, 47.26; H, 8.37; N, 7.79.

**(S)-*N*-tert-Butyldimethylsilyl-4-(2,2-dibromoethenyl)-2-azetidinone (94).** To a solution of CBr<sub>4</sub> (3.11 g, 9.38 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) was added dropwise a solution of PPh<sub>3</sub> (4.92 g, 18.8 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 ml) at 0 °C. After stirring at the same temperature for 10 min, a solution of **91** (1.00 g, 4.69 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) was added dropwise at 0 °C and the resulting mixture was stirred for 20 min at the same temperature. The mixture was poured into saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The extract was washed with water, dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with Et<sub>2</sub>O/hexane (1:5) to give **94** (0.83 g, 48%) as a pale yellow oil: IR (neat) 3450, 3300, 2940, 2850, 1740, 1600 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.12 (s, 3H), 0.16 (s, 3H), 0.85 (s, 9H), 2.75 (dd, *J* = 2.8, 15.6 Hz, 1H), 3.30 (dd, *J* = 5.6, 15.6 Hz, 1H), 4.13-4.22 (m, 1H), 6.38 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H); MS (APCI)  $m/z$  370 (M+H)<sup>+</sup>.

**(S)-N-tert-Butyldimethylsilyl-4-ethynyl-2-azetidinone (95).** To a solution of **94** (630 mg, 1.71 mmol) was added LiN(TMS)<sub>2</sub> (1.0 M solution in n-hexane, 3.75 mmol) at -75 °C. After stirring at -75°C for 1 h, a saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution was added and extracted with EtOAc. The extract was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with Et<sub>2</sub>O/hexane (1:5) to give **95** (220 mg, 56%) as a colorless oil: IR (nujol) 3420, 3250, 2100, 1720 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.19 (s, 6H), 0.88 (s, 9H), 2.35 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 3.02 (dd, *J* = 3.0, 15.1 Hz, 1H), 3.28 (dd, *J* = 5.6, 15.1 Hz, 1H), 4.00-4.05 (m, 1H); MS (APCI) *m/z* 210 (M+H)<sup>+</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -61.5° (*c* 1.00, MeOH).

**Ethyl (S)-3-amino-4-pentynoate hydrochloride (96).** To a solution of **95** (120 mg, 0.57 mmol) in EtOH (3 ml) was added 4N HCl in EtOH (2 ml, 8.0 mmol) at room temperature. After stirring at room temperature for 1 h, the mixture was evaporated in vacuo. The residue was recrystallized from Et<sub>2</sub>O to give **96** (57 mg, 56%) as a white solid. The ratio of enantiomers was determined to be 99.5:0.5 by chiral HPLC using CROWNPAK CR(+): IR (nujol) 3210, 2190, 1710, 1560 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 2.84 (dd, *J* = 16.1, 9.1 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 16.1, 5.0 Hz, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.29 (m, 1H), 8.94 (br, 3H); MS (APCI) *m/z* 142 (M+H)<sup>+</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -7.1° (*c* 1.00, MeOH); Anal. Calcd for C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>·HCl·0.1EtOH: C, 47.45; H, 6.97; N, 7.69. Found: C, 47.78; H, 7.12; N, 7.88.

**tert-Butyl 4-{3-[(3R)-3-({[(1R)-3-ethoxy-3-oxo-1-(2-phenylethyl)propyl]amino}carbonyl)-1-piperidinyl]-3-oxopropyl}-1-piperidinecarboxylate (98).** To the solution of **84** (600 mg, 2.71 mmol), **49** (1.00 g, 2.71 mmol) and HOBT (370 mg, 2.71 mmol) in DMF (6 ml) was added EDC (0.49 ml, 2.71 mmol) at 0 °C. After stirring at ambient temperature overnight, the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The extract was washed with water, brine and dried

over MgSO<sub>4</sub>, and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with CHCl<sub>3</sub>/MeOH (100:1) to give **98** as an oil (1.55 g, 100%): IR (neat) 3450, 3310, 2980, 2930, 2860, 1720, 1640 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, rotomer observed) δ 1.01-1.20 (m, 2H), 1.22-1.30 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.45-2.05 (m, 13H), 2.28-2.72 (m, 8H), 3.16-3.59 (m, 2H), 3.91-4.48 (m, 4H), 4.11 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.40 (d, *J* = 9.0 Hz, 1/3H), 6.76 (d, *J* = 8.8 Hz, 2/3H), 7.16-7.31 (m, 5H); MS (APCI) *m/z* 572 (M+H)<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-[3-((3*R*)-3-[(3-methoxy-3-oxo-1-phenylpropyl)amino]carbonyl)-1-piperidinyl]-3-oxopropyl]-1-piperidinecarboxylate (97).** This compound was prepared from **49** and **65** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (83%): IR (neat) 2940, 2860, 1735, 1630 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.99-1.24 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.45-1.89 (m, 9H), 2.00-2.16 (m, 1H), 2.25-2.44 (m, 3H), 2.61-2.96 (m, 4H), 3.19-3.55 (m, 2H), 3.55 (s, 3H), 3.62-4.48 (m, 4H), 5.37-5.47 (m, 1H), 7.28-7.35 (m, 5H); MS (APCI) *m/z* 530 (M+H)<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-(3-((3*R*)-3-[(*1R*)-3-methoxy-1-[2-(4-methoxyphenyl)ethyl]-3-oxopropyl]amino)carbonyl)-1-piperidinyl)-3-oxopropyl)-1-piperidinecarboxylate (99).** This compound was prepared from **49** and **85** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (92%): IR (neat) 2930, 2860, 1730, 1630 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.02-1.21 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.53-1.89 (m, 10H), 2.00-2.23 (m, 1H), 2.29-2.73 (m, 9H), 3.16-3.59 (m, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.91 (dd, *J* = 13.8, 3.6 Hz, 1H), 4.08 (d, *J* = 12.7 Hz, 2H), 4.23-4.37 (m, 1H), 6.72-6.80 (m, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.09 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H); MS (APCI) *m/z* 588 (M+H)<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-(3-((3*R*)-3-[(*1R*)-3-methoxy-1-[2-(3-methoxyphenyl)ethyl]-3-oxopropyl]amino)carbonyl)-1-piperidinyl)-3-oxopropyl)-1-piperidinecarboxylate (100).** This compound was

prepared from **49** and **86** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (88%): IR (neat) 3280, 1640, 1420, 1240, 1150, 860, 740, 680  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  0.80-1.15 (m, 6H), 1.38 (s, 9H), 1.50-1.96 (m, 6H), 2.02-3.10 (m, 16H), 3.55 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.95 (m, 2H), 4.08-4.22 (m, 1H), 6.73 (m, 3H), 7.17 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 8.31 (s, 1H); MS (APCI)  $m/z$  588 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl 4-(3-((3*R*)-3-(((1*R*)-3-methoxy-1-[2-(2-methoxyphenyl)ethyl]-3-oxopropyl)amino)carbonyl]-1-piperidinyl)-3-oxopropyl)-1-piperidinecarboxylate (101).** This compound was prepared from **49** and **87** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (90%): IR (neat) 2990, 2930, 2860, 1725, 1660, 1620  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.00-1.21 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.53-2.15 (m, 11H), 2.21-2.38 (m, 3H), 2.48-2.66 (m, 6H), 3.15-3.60 (m, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.86-4.50 (m, 4H), 6.23-6.35 (m, 1H), 6.64 (d,  $J = 8.6\text{Hz}$ , 1H), 6.81-6.91 (m, 2H), 7.09-7.19 (m, 2H); MS (APCI)  $m/z$  588 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl 4-(3-((3*R*)-3-(((1*R*)-1-[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]-3-methoxy-3-oxopropyl)amino)carbonyl]-1-piperidinyl)-3-oxopropyl)-1-piperidinecarboxylate (102).** This compound was prepared from **49** and **88** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (100%): IR (neat) 3290, 2980, 2925, 2850, 1720, 1650, 1620  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.02-1.23 (m, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.45-1.94 (m, 9H), 2.03-2.73 (m, 11H), 3.18-3.67 (m, 3H), 3.66 (s, 3H), 3.85 (s, 3H), 3.88 (s, 3H), 3.92-4.11 (m, 2H), 4.23-4.47 (m, 1H), 6.69-6.81 (m, 4H); MS (APCI)  $m/z$  618 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl 4-[3-((3*R*)-3-(((1*R*)-3-methoxy-3-oxo-1-{2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]ethyl}propyl)amino)carbonyl]-1-piperidinyl)-3-oxopropyl)-1-piperidinecarboxylate (103).** This compound

was prepared from **49** and **89** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (62%): IR (neat) 2980, 2925, 2860, 1720, 1645  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.00-1.21 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.45-1.72 (m, 9H), 1.84-2.20 (m, 3H), 2.34-2.77 (m, 9H), 3.39-3.50 (m, 1H), 3.63-3.69 (m, 4H), 3.80-3.81 (m, 1H), 4.02-4.17 (m, 2H), 4.25-4.39 (m, 1H), 6.45-6.93 (m, 1H), 7.35-7.43 (m, 4H); MS (APCI)  $m/z$  626 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-{3-[(3R)-3-({[(1S)-1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-2-propen-1-yl]amino}carbonyl)-1-piperidinyl]-3-oxopropyl}-1-piperidinecarboxylate (104).** This compound was prepared from **49** and **93** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (100%): IR (neat) 3300, 1720, 1680, 1630, 1530  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.03-1.21 (m, 2H), 1.26 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.52-2.05 (m, 10H), 2.33-2.41 (m, 3H), 2.55-2.73 (m, 4H), 3.27-3.54 (m, 2H), 4.07-4.18 (m, 5H), 4.62-4.90 (m, 1H), 5.12-5.24 (2H, m), 5.84 (ddd,  $J = 17.2, 10.4, 5.5$  Hz, 1H), 6.64-6.92 (m, 1H); MS (APCI)  $m/z$  494 ( $\text{M}+\text{H}$ )<sup>+</sup>.

**tert-Butyl 4-{3-[(3R)-3-({[(1S)-1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-2-propyn-1-yl]amino}carbonyl)-1-piperidinyl]-3-oxopropyl}-1-piperidinecarboxylate (105).** This compound was prepared from **49** and **96** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (100%): IR (neat) 3280, 1730, 1670, 1630, 1530  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.00-1.18 (m, 2H), 1.26-1.33 (t,  $J = 7.4$  Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.59-1.69 (m, 2H), 1.64 (s, 3H), 2.09-2.31 (m, 5H), 2.61-2.96 (m, 5H), 3.44-3.76 (m, 4H), 4.15-4.19 (m, 2H), 4.22 (q,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 5.05-5.12 (m, 1H), 6.50-6.70 (m, 1H).

**(3R)-3-{[[(3R)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl]carbonyl]amino}-5-phenylpentanoic acid (107).** To a solution of **98** (1.55 g, 2.71 mmol) in THF (10 ml), EtOH (10 ml) and water (10 ml) was added LiOH (340 mg, 8.13 mmol) at 0 °C. After stirring at



ambient temperature for 1 h, the mixture was acidified with 10% KHSO<sub>4</sub> solution and extracted with EtOAc. The extract was washed with water, brine and dried over MgSO<sub>4</sub> and evaporated in vacuo to give **107** as an oil (1.20 g, 97%): IR (neat) 3400, 2920, 2850, 1700, 1640 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.63-0.86 (m, 2H), 1.17 (s, 9H), 1.17-1.29 (m, 8H), 1.36-1.66 (m, 5H), 2.04-2.18 (m, 4H), 2.30-2.54 (m, 5H), 3.49-3.90 (m, 4H), 3.95-4.23 (m, 1H), 6.94-7.09 (m, 5H), 7.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H); MS (APCI) *m/z* 544 (M+H)<sup>+</sup>.

**3-(((3*R*)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl)amino}-3-phenylpropanoic acid (**106**).** This compound was prepared from **97** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (86%): IR (neat) 3380, 3020, 2940, 2870, 1710, 1660, 1630 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.86-1.06 (m, 2H), 1.21-1.91 (m, 9H), 1.38 (s, 9H), 2.16-2.35 (m, 3H), 2.58-2.67 (m, 5H), 2.86-3.06 (m, 1H), 3.63-3.97 (m, 3H), 4.05-4.42 (m, 1H), 5.11-5.23 (m, 1H), 7.17-7.31 (m, 5H), 8.40-8.47 (m, 1H); MS (APCI) *m/z* 516 (M+H)<sup>+</sup>.

**(3*R*)-3-(((3*R*)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl)amino}-5-(4-methoxyphenyl)pentanoic acid (**108**).** This compound was prepared from **99** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (85%): IR (neat) 3400, 3930, 3860, 1700, 1630 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.85-1.09 (m, 2H), 1.25-1.49 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.39-1.88 (m, 8H), 2.10-2.72 (m, 9H), 2.89-3.16 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.77-4.06 (m, 4H), 4.12-4.39 (m, 1H), 6.82 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 12.08 (s, 1H); MS (APCI) *m/z* 574 (M+H)<sup>+</sup>.

**(3*R*)-3-(((3*R*)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl)amino}-5-(3-methoxyphenyl)pentanoic acid (**109**).** This compound was prepared from **100** using

a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (72%):  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.92-1.12 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.38-1.98 (m, 13H), 2.03-3.20 (m, 14H), 3.72 (s, 3H), 3.75-4.38 (m, 6H), 6.73 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 7.17 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 7.84 (d,  $J = 8.6$  Hz, 1H), MS (APCI)  $m/z$  574 (M+H) $^+$ .

**(3R)-3-[[[(3R)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl]amino]-5-(2-methoxyphenyl)pentanoic acid (110).** This compound was prepared from **101** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (72%): IR (neat) 3290, 3000, 2930, 2850, 1715, 1640, 1615  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.84-1.08 (m, 2H), 1.30-1.45 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.59-1.91 (m, 7H), 2.09-2.74 (m, 10H), 2.89-3.18 (m, 1H), 3.71-4.02 (m, 4H), 3.75 (s, 3H), 4.16-4.39 (m, 1H), 6.81-6.94 (m, 2H), 7.07-7.20 (m, 2H), 7.84 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 12.12 (s, 1H); MS (APCI)  $m/z$  574 (M+H) $^+$ .

**(3R)-3-[[[(3R)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl]amino]-5-(3,4-dimethoxyphenyl)pentanoic acid (111).** This compound was prepared from **102** using a procedure similar to that employed for the preparation of **117** (87%): IR (neat) 3300, 3430, 3360, 1720, 1640, 1625  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  0.83-1.10 (m, 2H), 1.21-1.46 (m, 4H), 1.38 (s, 9H), 1.61-1.91 (m, 8H), 2.07-2.73 (m, 10H), 2.87-3.20 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 3.76-4.08 (m, 3H), 6.64-6.68 (m, 1H), 6.74-6.85 (m, 2H), 7.83 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H), 11.97-12.14 (br, 1H); MS (APCI)  $m/z$  604 (M+H) $^+$ .

**(3R)-3-[[[(3R)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl]amino]-5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]pentanoic acid (112).** This compound was prepared from **103** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (86%): IR (neat) 3280,

2920, 2850, 1720, 1630  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  0.86-1.09 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.30-1.44 (m, 4H), 1.59-1.86 (m, 6H), 2.28-2.40 (m, 5H), 2.60-2.74 (m, 5H), 2.82-3.14 (m, 1H), 3.71-4.05 (m, 5H), 4.15-4.40 (m, 1H), 7.48-7.56 (m, 4H), 7.85-7.90 (m, 1H); MS (APCI)  $m/z$  612 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**(3S)-3-(((3R)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl)amino}-4-pentenoic acid (113).** This compound was prepared from **104** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (100%). This compound was used for the next step without further purification.

**(3S)-3-(((3R)-1-{3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]propanoyl}-3-piperidinyl)carbonyl)amino}-4-pentynoic acid (114).** This compound was prepared from **105** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (100%): IR (KBr) 3430, 3300, 1731, 1686, 1662  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  0.92-1.17 (m, 2H), 1.38 (s, 9H), 1.49-1.77 (m, 9H), 1.91 and 1.99 (s, total 1H), 2.13-2.64 (m, 8H), 2.89-3.06 (m, 1H), 3.17-3.28 (m, 1H), 3.76-4.32 (m, 3H), 4.78-4.84 (m, 1H), 8.37-8.44 (m, 1H), 12.39 (br, 1H).

**(3R)-5-Phenyl-3-(((3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl)carbonyl)amino]pentanoic acid hydrochloride (63d).** To the solution of **107** (1.20 g, 2.59 mmol) in EtOAc (12 ml) was added 4 N HCl in EtOAc (6.47 ml, 25.9 mmol) at 0  $^\circ\text{C}$ . After stirring at ambient temperature for 2 h, the resulting precipitate was collected on a Büchner funnel, washed with  $\text{Et}_2\text{O}$  and dried in vacuo to give **63d** (77%): IR (nujol) 3300, 1700, 1620  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1.03-1.91 (m, 13H), 2.06-3.07 (m, 11H), 3.12-3.24 (m, 2H), 3.70-3.90 (m, 1H), 3.78-4.38 (m, 2H), 7.16-7.51 (m, 5H), 7.93-8.05 (m, 1H), 8.71-9.01 (m, 1H), 9.08-9.20 (br, 1H); MS (APCI)  $m/z$  444 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; Anal. Calcd for  $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot \text{HCl} \cdot 2.7\text{H}_2\text{O}$ : C, 56.80; H, 8.27; N, 7.95. Found: C, 56.94; H, 8.01; N, 7.58.

**(3S)-Phenyl-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidiny)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonyl]amino]propanoic acid trifluoroacetate (63a), and (3R)-Phenyl-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidiny)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonyl]amino]propanoic acid trifluoroacetate (63b).** This compound was prepared from **106** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d**. The two diastereomers were separated by using preparative HPLC (34% for **3a**, 43% for **3b**). **63a**: IR (neat) 3250, 2960, 1710, 1600  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.12-1.85 (m, 11H), 2.11-2.36 (m, 3H), 2.66 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.79-3.11 (m, 3H), 3.17-3.29 (m, 2H), 3.63-3.84 (m, 1H), 4.11-4.33 (m, 2H), 5.11-5.23 (m, 1H), 7.24-7.34 (m, 5H), 8.07-8.23 (br, 1H), 8.40 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H), 8.40-8.53 (br, 1H); MS (APCI)  $m/z$  416 (M+H) $^+$ ; HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$  (M+H) $^+$ : 416.2549, found: 416.2539;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$   $-1.20^\circ$  ( $c$  1.0, MeOH). **63b**: IR (neat) 2910, 2850, 1710, 1630  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ , rotomer observed)  $\delta$  1.17-1.85 (m, 11H), 2.12-2.36 (m, 2+1/2H), 2.60-3.28 (m, 7+1/2H), 3.71-3.83 (m, 1H), 4.12-4.38 (m, 2H), 5.18 (q,  $J = 7.8$  Hz, 1H), 7.20-7.38 (m, 5H), 8.18-8.32 (br, 1H), 8.42 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 8.54-8.64 (br, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_4$  (M+H) $^+$ : 416.2549, found: 416.2549;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$   $-39.62^\circ$  ( $c$  0.45, MeOH). The absolute configurations of these epimers were determined by the HPLC analysis compared with the authentic sample prepared from optically-active ethyl (*S*)-3-amino-3-phenylpropionate.

**(3R)-5-(4-Methoxyphenyl)-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidiny)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonyl]amino]pentanoic acid hydrochloride (63e).** This compound was prepared from **108** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d** (93%); IR (nujol) 1715, 1620, 1600  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.22-1.86 (m, 12H), 2.11-3.24 (m, 12H), 3.71-4.36 (m, 5H), 3.71 (s, 3H), 6.82 (d,  $J = 8.6$  Hz, 2H), 7.08 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2H), 7.90 (t,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 8.63-8.74 (br, 1H), 8.90-9.01 (br, 1H); MS (APCI)  $m/z$  474 (M+H) $^+$ ;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$   $-43.1^\circ$  ( $c$  1.0, MeOH); Anal. Calcd for

C<sub>26</sub>H<sub>39</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>·HCl·2H<sub>2</sub>O: C 57.19, H 8.12, N 7.69. Found: C 56.82, H 8.17, N 7.51.

**(3R)-5-(3-Methoxyphenyl)-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]pentanoic acid hydrochloride (63f).** This compound was prepared from **109** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d** (84%): IR (nujol) 1710, 1600, 720 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.13-2.00 (m, 14H), 2.01-3.70 (m, 9H), 3.17-3.29 (m, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.97-4.08 (m, 1H), 4.10-4.37 (m, 1H), 6.72-6.75 (m, 3H), 7.13-7.22 (m, 1H), 7.88-7.98 (m, 1H), 8.73 (br, 1H), 8.99 (br, 1H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 474.2968, found: 474.2985; [α]<sup>19</sup><sub>D</sub> -20.7° (*c* 1.16, MeOH).

**(3R)-5-(2-Methoxyphenyl)-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]pentanoic acid hydrochloride (63g).** This compound was prepared from **110** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d** (100%): IR (nujol) 1725, 1640, 1600 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.21-1.91 (m, 16H), 2.30-3.24 (m, 11H), 3.75 (s, 3H), 3.70-3.89 (m, 1H), 4.12-4.39 (m, 1H), 6.81-6.94 (m, 2H), 7.07-7.20 (m, 2H), 7.84-7.94 (m, 1H), 8.60-8.75 (br, 1H), 8.91-9.03 (br, 1H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>26</sub>H<sub>40</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 474.2968, found: 474.2962; [α]<sup>20</sup><sub>D</sub> -17.7° (*c* 1.0, MeOH).

**(3R)-5-(3,4-Dimethoxyphenyl)-3-[(3R)-1-[3-(4-piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]pentanoic acid hydrochloride (63h).** This compound was prepared from **111** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d** (100%): IR (nujol) 1730, 1635 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.05-1.50 (m, 9H), 1.66-1.83 (m, 8H), 1.83-3.23 (m, 11H), 3.71 (s, 3H), 3.73 (s, 3H), 4.15-4.38 (m, 2H), 6.65-6.69 (m, 1H), 6.77-6.85 (m, 2H), 8.88-9.02 (br, 1H), 9.15-9.25 (br, 1H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>27</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 504.3074, found: 504.3072.

**(3R)-3-[(3R)-1-[3-(4-Piperidiny)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]-5-[3-(trifluoromethyl)phenyl]pentanoic acid hydrochloride (63i).** This compound was prepared from **112** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d** (90%): IR (nujol) 3300, 1715, 1630, 1610  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1.23-2.13 (m, 14H), 2.35-2.45 (m, 5H), 2.61-2.83 (m, 5H), 3.15-3.28 (m, 2H), 3.72-3.89 (m, 1H), 3.99-4.10 (m, 1H), 4.15-4.41 (m, 1H), 7.49-7.55 (m, 4H), 7.94-8.05 (m, 1H), 8.75-8.93 (m, 1H), 9.03-9.17 (m, 1H); MS (APCI)  $m/z$  512 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ;  $[\alpha]_D^{20}$  -21.4 $^\circ$  ( $c$  1.0, MeOH); Anal. Calcd for  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_4 \cdot \text{HCl} \cdot 1.8\text{H}_2\text{O}$ : C 53.80, H 7.05, N 7.24. Found: C 53.72, H 7.10, N 7.02.

**(3S)-3-[(3R)-1-[3-(4-Piperidiny)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]-4-pentenoic acid hydrochloride (63j).** This compound was prepared from **113** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d** (100%): IR (KBr) 3429, 2947, 1724, 1629, 1621  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1.17-1.99 (m, 11H), 2.32-2.60 (m, 5H), 2.75-3.00 (m, 2H), 3.19-3.24 (m, 2H), 3.82-4.38 (m, 4H), 4.54-4.62 (m, 1H), 5.05-5.12 (m, 2H), 5.74-5.92 (m, 1H), 8.00-8.06 (m, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_4$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 366.2393, found: 366.2400.

**(3S)-3-[(3R)-1-[3-(4-Piperidiny)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonylamino]-4-pentynoic acid (63k).** This compound was prepared from **114** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d** (70%): IR (KBr) 3425, 3250, 1726, 1638, 1614  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  1.27-1.83 (m, 11H), 2.08-2.32 (m, 3H), 2.58-3.09 (m, 5H), 3.18-3.22 (m, 3H), 3.75-3.80 (m, 1H), 4.08-4.32 (m, 1H), 4.79-4.82 (m, 1H), 8.42-8.54 (m, 1H), 8.75 (br, 1H), 9.04 (br, 1H); MS (APCI)  $m/z$  364 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; Anal. Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$ : C 61.27, H 8.12, N 11.28. Found: C 61.10, H 8.23, N 11.10.

**tert-Butyl 4-{3-[(3R)-3-([(1S)-1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-1-propanyl]amino)carbonyl]-1-piperidinyl]-3-oxopropyl}-1-piperidinecarboxylate (115).** To a solution of **104** (800 mg, 1.62 mmol) in EtOH (10 ml) was added PtO<sub>2</sub> (200 mg), and the mixture was stirred under H<sub>2</sub> atmosphere (1 atm) at room temperature for 2 h. The catalyst was filtered off, and the filtrate was evaporated off to give **115** (730 mg, 91%) as an oil: IR (neat) 3280, 1720, 970, 860, 770 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.99-1.22 (m, 2H), 1.24 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H), 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.45-2.16 (m, 11H), 2.21-2.58 (m, 5H), 2.60-2.80 (m, 2H), 3.18-3.60 (m, 2H), 3.80-4.32 (m, 7H), 6.28-6.78 (m, 1H).

**(3R)-3-([(3R)-1-[3-(4-Piperidinyl)propanoyl]-3-piperidinyl]carbonyl)amino]pentanoic acid hydrochloride (63c).** This compound was prepared from **115** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** and **63d** (90% in 2 steps): IR (KBr) 3408, 3257, 1724, 1637 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.76-0.83 (t, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.21-1.91 (m, 14H), 2.18-2.40 (m, 5H), 2.59-3.23 (m, 5H), 3.76-4.35 (m, 3H), 7.73-7.83 (m, 1H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 368.2549, found: 368.2554.

**4-(2-Trimethylsilylethynyl)-2-azetidinone (117).** To a solution of 1-trimethylsilylacetylene (1715 ml, 12.4 mol) in THF (18.0 L) was added ethyl magnesium chloride (2.0M solution in THF; 6.19 L, 12.38 mol) dropwise below -30 °C under N<sub>2</sub> atmosphere. The reaction mixture was allowed to 0 °C and stirred for 1 h. After cooling to -30 °C, 4-acetoxy-2-azetidinone (**116**) (320 g, 2.48 mol) was added and the reaction mixture was warmed to room temperature, and stirred for 2 h. After cooling to -20 °C, saturated NH<sub>4</sub>Cl solution (4.0 L) and extracted with EtOAc (20 L). The organic layer was washed with water (10 L x 2) and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered off and

evaporated in vacuo to give **117** (425 g, 102%), which was essentially pure. It was used to the next step without further purification: IR (nujol) 3150, 2130, 1740, 1330, 1240, 1090, 1060, 950, 840, 750, 740  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.16 (s, 9H), 3.02 (ddd,  $J = 14.7, 2.7, 1.6$  Hz, 1H), 3.30 (ddd,  $J = 14.7, 5.3, 1.8$  Hz), 4.24 (dd,  $J = 5.3, 2.7$  Hz, 1H), 6.41 (br, 1H).

***N*-Hydroxymethyl-4-(2-trimethylsilylethynyl)-2-azetidinone (118).** **117** (285 g, 1.70 mol) and paraformaldehyde (153 g, 5.1 mol) was heated at 135 °C for 45 min. The resulting mixture was cooled to room temperature and purified by column chromatography on silica gel with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$  (8:2) to give **118** (429 g, 75%) as a solid: IR (nujol) 3300, 1710, 1280, 1230, 1020, 820  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.18 (s, 9H), 3.02 (dd,  $J = 14.8, 2.7$  Hz, 1H), 3.26 (dd,  $J = 14.8, 5.4$  Hz, 1H), 3.69 (dd,  $J = 9.4, 5.3$  Hz, 1H), 4.41 (m, 2H), 5.01 (dd,  $J = 11.8, 5.2$  Hz, 1H); MS (FAB)  $m/z$  197 (M+H)<sup>+</sup>.

***(R)*-*N*-Hydroxymethyl-4-(2-trimethylsilylethynyl)-2-azetidinone (119).** To a solution of **118** (200 g, 1.01 mol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.0 L) and IPE (4.0 L) was added vinyl acetate (280 ml, 3.04 mol) and Lipase PS<sup>®</sup> (Amano Enzyme Co., Ltd., 152 g). The mixture was warmed to 37° C and stirred for 16 h. Catalyst was filtered off and washed with  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Solvent was evaporated in vacuo. The residue was subjected to a column chromatography on silica gel with hexane/EtOAc (8:2 to 0:1) to give **119** (77.8 g, 39%): IR (nujol) 3300, 1710, 1280, 1230, 1020, 820  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.18 (s, 9H), 3.02 (dd,  $J = 14.8, 2.7$  Hz, 1H), 3.26 (dd,  $J = 14.8, 5.4$  Hz, 1H), 3.69 (dd,  $J = 9.4, 5.3$  Hz, 1H), 4.41 (m, 2H), 5.01 (dd,  $J = 11.8, 5.2$  Hz, 1H); MS (FAB)  $m/z$  197.8 (M+H)<sup>+</sup>;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} -130.3^\circ$  ( $c$  1.18,  $\text{CHCl}_3$ ).

***(S)*-4-Ethynyl-2-azetidinone (121).** To saturated aqueous  $\text{NH}_3$  solution (300 ml) and MeOH (1000



ml) was added **119** (101 g, 513 mmol). The resulting mixture was stirred at room temperature overnight. Solvent was evaporated in vacuo and the residue was added EtOAc and washed with water (x 3), and brine. The organic layer was dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered off and evaporated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/ EtOAc (9:1) to give **121** (29.8 g, 61%): IR (nujol) 3200, 2080, 1400, 1320, 1160 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 2.46 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.11 (ddd, *J* = 14.8, 2.5, 1.6 Hz, 1H), 3.35 (ddd, *J* = 14.8, 5.3, 1.8 Hz, 1H), 4.27 (m, 1H), 6.46 (br, 1H); [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -63.3° (*c* 1.09, CHCl<sub>3</sub>).

**Ethyl (S)-3-amino-4-pentynoate hydrochloride (96).** To a solution of **121** (28.5 g, 300 mmol) in EtOH (140 ml) was added a solution of HCl in EtOH (5.86 N) below 10 °C, and stirred for 1 h at room temperature. The mixture was evaporated in vacuo. The residue was washed with Et<sub>2</sub>O and collected by filtration to give **96** (50.3 g, 94%) as white crystal. The enantiomer ratio was determined by chiral HPLC using CROWNPAK CR(+) (DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.): IR (nujol) 3210, 2190, 1710, 1560 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.21 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 2.84 (dd, *J* = 16.1, 9.1 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 16.1 and 5.0 Hz, 1H), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.29 (m, 1H), 8.94 (br, 3H); MS (APCI) *m/z* 142 (M+H)<sup>+</sup>; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> -6.27° (*c* 1.11, MeOH); Anal. Calcd for C<sub>7</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>·HCl: C, 47.33; H, 6.81; N, 7.89. Found: C, 47.39; H, 6.73; N, 7.84.

**1-tert-Butyl 4-ethyl 1,4-piperidinedicarboxylate (123).** To a solution of ethyl isonipecotate (**122**) (1.00 g, 6.36 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 ml) were added Et<sub>3</sub>N (1.06 ml, 7.63 mmol) and (Boc)<sub>2</sub>O (1.67 g, 7.63 mmol) successively. The mixture was stirred for 1 h at room temperature. To the resulting mixture was added water and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo to give **123** (1.64 g, 100%) as an oil: IR (neat) 2970, 1730, 1685, 1420, 1170 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.26 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H),

1.57-1.72 (m, 2H), 1.81-1.97 (m, 2H), 2.36-2.51 (m, 1H), 2.77-2.91 (m, 2H), 3.77-3.78 (m, 2H), 4.14 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H); MS (APCI)  $m/z$  258 (M+H)<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl 4-[(1*E*)-3-ethoxy-3-oxo-1-propen-1-yl]-1-piperidinecarboxylate (124).** To a solution of **123** (2.57 g, 10.0 mmol) in toluene (26 ml) was added dropwise DIBAL (1.01 M in toluene, 10.2 ml, 10.3 mmol) at  $-75$  °C. It was stirred for 1 h at the same temperature. The resulting mixture was poured into saturated aqueous NH<sub>4</sub>Cl solution and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was dissolved in THF (5 ml) and it was added dropwise at room temperature to the solution of Horner-Emmons reagent which has been prepared from NaH (60% dispersion in mineral oil, 440 mg, 11.0 mmol) and triethyl phosphonoacetate (2.47 g, 11.0 mmol) in THF (50 ml) in advance. The mixture was stirred for 1 h at the same temperature. The resulting mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water, and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography on silica gel with hexane/EtOAc (5:1) to give **124** (2.43 g, 86%) as an oil: IR (neat) 2977, 2933, 2854, 1716, 1697, 1423, 1365, 1176, 1039, 970, 872, 766 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  1.22-1.45 (m, 2H), 1.29 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.45 (s, 9H), 1.65-1.80 (m, 2H), 2.18-2.42 (m, 1H), 2.66-2.86 (m, 2H), 4.02-4.23 (m, 2H), 4.19 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 5.80 (dd,  $J = 15.7, 1.4$  Hz, 2H), 6.90 (dd,  $J = 15.7, 6.6$  Hz, 2H); MS (ESI)  $m/z$  306.3 (M+Na)<sup>+</sup>.

**(2*E*)-3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]acrylic acid (125).** To a solution of **124** (2.40 g, 8.48 mmol) in THF (12 ml) and EtOH (12 ml) was added dropwise 1 N aqueous NaOH solution (25.4 ml, 25.4 mmol) under ice cooling and the mixture stirred overnight at room temperature. Volatiles were evaporated off and residual aqueous solution was adjusted to pH 3 with 10% aqueous

KHSO<sub>4</sub> solution, and extracted with EtOAc. The organic layer was washed with water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in vacuo. The residue was triturated with hexane, collected and dried in vacuo to give **125** (1.92 g, 88%) as a solid: IR (KBr) 3002, 2976, 2927, 1691, 1679, 1412, 1284, 1234, 1178, 1109, 1012, 987, 943, 775, 544 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.25-1.50 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.68-1.82 (m, 2H), 2.12-2.45 (m, 1H), 2.65-2.88 (m, 2H), 4.02-4.22 (m, 2H), 5.82 (dd, *J* = 15.8, 1.2 Hz, 1H), 7.01 (dd, *J* = 15.8, 6.6 Hz, 1H); MS (ESI) *m/z* 278.2 (M+Na)<sup>+</sup>.

***tert*-Butyl 4-{(1*E*)-3-[(3*R*)-3-(ethoxycarbonyl)-1-piperidinyl]-3-oxo-1-propen-1-yl}-1-piperidine carboxylate (126).** This compound was prepared from **125** and **47** using a procedure similar to that employed for the preparation of **49** (96%): IR (neat) 1730, 1680, 1660, 1615, 1420, 1170, 970, 870, 760 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.15-1.46 (m, 2H), 1.27 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.62-1.82 (m, 8H), 2.02-2.14 (m, 1H), 2.21-2.36 (m, 1H), 2.64-2.83 (m, 2H), 3.02-3.10 (m, 1H), 4.08-4.17 (m, 2H), 4.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H), 6.27 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 6.81 (dd, *J* = 15.2, 6.7 Hz, 1H).

**(3*R*)-1-{(2*E*)-3-[1-(*tert*-Butoxycarbonyl)-4-piperidinyl]-2-propenoyl}-3-piperidinecarboxylic acid (127).** This compound was prepared from **126** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (74%): IR (neat) 1715, 1680, 1660, 1570, 1170, 1000, 960 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.08-1.31 (m, 2H), 1.39 (s, 9H), 1.65-1.70 (m, 5H), 2.24-2.41 (m, 2H), 2.74-2.82 (m, 2H), 3.04 (t, *J* = 10.9 Hz, 1H), 3.32-3.46 (m, 2H), 3.85-3.98 (m, 3H), 6.43 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H), 6.60 (dd, *J* = 15.8, 5.4 Hz, 1H) 12.40 (s, 1H); MS (APCI) *m/z* 367 (M+H)<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>19</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: C, 62.27; H, 8.25; N, 7.64. Found: C, 62.24; H, 8.49; N, 7.59.

***tert*-Butyl 4-{(1*E*)-3-[(3*R*)-3-({[(1*S*)-1-(2-ethoxy-2-oxoethyl)-2-propyn-1-yl]amino}carbonyl)-1-**

**piperidiny]-3-oxo-1-propen-1-yl]-1-piperidinecarboxylate (128).** This compound was prepared from **127** using a procedure similar to that employed for the preparation of **98** (74%): IR (neat) 1715, 1660, 1640, 1360, 1160  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.05-1.57 (m, 2H), 1.28 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.70-1.80 (m, 3H), 1.92-2.10 (m, 2H), 2.24-2.40 (m, 2H), 2.28 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 2.70-2.85 (m, 4H), 3.22-3.41 (m, 2H), 3.65-3.80 (m, 1H), 4.07-4.25 (m, 4H), 4.18 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H), 5.05-5.17 (m, 1H), 6.22 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H), 6.83 (dd,  $J = 15.1, 7.1$  Hz, 1H) 7.02-7.18 (m, 1H); MS (APCI)  $m/z$  490 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**(3S)-3-[[[(3R)-1-[(2E)-3-[1-(tert-Butoxycarbonyl)-4-piperidiny]-2-propenoyl]-3-piperidiny]carbonyl]amino]-4-pentynoic acid (129).** This compound was prepared from **128** using a procedure similar to that employed for the preparation of **107** (97%): IR (neat) 3270, 2925, 2855, 1720, 1650, 1600  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  1.17-1.32 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 1.39-1.86 (m, 7H), 2.11-2.40 (m, 2H), 2.55-3.11 (m, 6H), 3.21 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 3.90-3.98 (m, 2H), 4.13-4.45 (m, 1H), 4.75-4.88 (m, 1H), 6.42 (d,  $J = 15.3$  Hz, 1H), 6.60 (dd,  $J = 15.3, 6.3$  Hz, 1H), 8.43 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H); MS (APCI)  $m/z$  462 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**(3S)-3-[[[(3R)-1-[(2E)-3-(4-piperidiny)-2-propenoyl]-3-piperidiny]carbonyl]amino]-4-pentynoic acid (63I).** This compound was prepared from **129** using a procedure similar to that employed for the preparation of **63d** (100%): IR (KBr) 2361, 1726, 1655, 1601, 1277, 1255, 1223, 1194  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  1.19-1.41 (m, 2H), 1.59-1.88 (m, 5H), 2.14-2.32 (m, 4H), 2.51-2.76 (m, 4H), 2.89-3.17 (m, 4H), 3.89-4.42 (m, 2H), 3.89-4.42 (m, 2H), 4.60-4.71 (m, 1H), 6.36 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H), 6.57 (dd,  $J = 15.1, 6.4$  Hz, 1H), 8.85 (m, 1H); MS (APCI)  $m/z$  366 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ ; Anal. Calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4 \cdot 1.1\text{H}_2\text{O}$ : C, 59.58; H, 7.74; N, 10.77. Found: C, 59.59; H, 7.78; N, 10.89.

**tert-Butyl 4-((1E)-3-oxo-3-((3R)-3-(((1S)-1-[2-oxo-2-(pentyloxy)ethyl]-2-propyn-1-yl)amino)carbonyl)-1-piperidinyl)-1-propen-1-yl)-1-piperidinecarboxylate (133).** To a mixture of **129** (600 mg), *n*-pentanol (0.16 ml, 1.43 mmol) and DMAP (16 mg, 0.13 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 ml) was added EDC·HCl (270 mg, 1.43 mmol) at 0 °C. After stirring at room temperature overnight, the solution was evaporated in vacuo. The residue was poured into water and extracted with EtOAc. The extract was washed with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub>, water and brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, evaporated in vacuo, subsequently. The residue was purified by column chromatography on silica gel with EtOAc/Hexane (1:1) to give **133** (650 mg, 94%) as a colorless oil: IR (neat): 2900, 2825, 1710, 1640, 1600 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 0.89-0.97 (m, 3H), 1.26-1.40 (m, 7H), 1.46 (s, 9H), 1.61-1.79 (m, 6H), 1.92-2.05 (m, 1H), 2.28 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H), 2.24-2.38 (m, 2H), 2.68-2.83 (m, 4H), 3.23-3.39 (m, 2H), 3.64-4.26 (m, 6H), 5.05-5.16 (m, 1H), 6.22 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 6.82 (dd, *J* = 15.2, 6.6 Hz, 1H), 7.07-7.16 (m, 1H); MS (APCI) *m/z* 532 (M+H)<sup>+</sup>.

**tert-Butyl**

**4-((1E)-3-((3R)-3-(((1S)-1-(2-butoxy-2-oxoethyl)-2-propyn-1-yl)amino)carbonyl)-1-piperidinyl)-1-propen-1-yl)-1-piperidinecarboxylate (132).** This compound was prepared from **129** and *n*-butanol using a procedure similar to that employed for the preparation of **133** (89%): <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 0.96 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.33 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.36-1.45 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.56-1.77 (m, 4H), 1.90-2.05 (m, 2H), 2.20-2.31 (m, 2H), 2.28 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.60-2.81 (m, 4H), 4.06-4.18 (m, 5H), 5.05-5.13 (m, 1H), 6.23 (d, *J* = 15.1 Hz, 1H), 6.82 (dd, *J* = 15.1, 6.7 Hz, 1H); MS (APCI) *m/z* 518 (M+H)<sup>+</sup>.

**tert-Butyl**

**4-((1E)-3-oxo-3-((3R)-3-(((1S)-1-[2-oxo-2-(2-phenylethoxy)ethyl]-2-propyn-1-yl)amino)carbon**

**yl]-1-piperidinyl]-1-propen-1-yl)-1-piperidinecarboxylate (134).** This compound was prepared from **129** and 2-phenethyl alcohol using a procedure similar to that employed for the preparation of **133** (100%): IR (neat) 2930, 2850, 1730, 1650, 1600  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.26-1.40 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.45-1.89 (m, 8H), 1.95-2.04 (m, 1H), 2.20-2.39 (m, 1H), 2.25 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 2.67-2.91 (m, 4H), 2.97 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 3.20-3.41 (m, 1H), 4.07-4.17 (m, 3H), 4.36 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 5.01-5.13 (m, 1H), 6.23 (d,  $J = 15.2$  Hz, 1H), 6.82 (dd,  $J = 15.2, 6.7$  Hz, 1H), 7.21-7.51 (m, 6H); MS (APCI)  $m/z$  566 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**tert-Butyl 4-((1E)-3-((3R)-3-(((1S)-1-(2-((2,2-dimethylpropanoyl)oxy)methoxy)-2-oxoethyl)-2-propyn-1-yl)amino)carbonyl)-1-piperidinyl]-3-oxo-1-propen-1-yl)-1-piperidinecarboxylate**

**(135).** To a solution of **129** (500 mg, 1.08 mmol) in DMF (5 ml) was added  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (75 mg, 0.54 mmol) under stirring at 0  $^\circ\text{C}$ , stirred for 15 min, and pivalic acid iodomethyl ester (310 mg, 1.30 mmol) in DMF (3 ml) was added to the mixture. After stirring at room temperature for 1 h the mixture was poured into water and extracted with EtOAc. The extract was washed with water and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and evaporated in vacuo, subsequently. The residue was purified by column chromatography on silica gel with  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (98:2) to give **135** (370 mg, 59%) as a colorless oil: IR (neat) 2960, 2920, 2850, 1745, 1650, 1600  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.22 (s, 9H), 1.32-1.60 (m, 3H), 1.46 (s, 9H), 1.69-1.80 (m, 3H), 1.89-2.03 (m, 2H), 2.16-2.40 (m, 5H), 2.28 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 2.70-2.85 (m, 4H), 3.33-3.51 (m, 1H), 4.04-4.18 (m, 3H), 5.04-5.17 (m, 1H), 5.77 (s, 2H), 6.24 (d,  $J = 15.1$  Hz, 1H), 6.83 (dd,  $J = 15.1, 6.6$  Hz, 1H); MS (APCI)  $m/z$  576 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

**Ethyl (3S)-3-(((3R)-1-((2E)-3-(4-piperidinyl)-2-propenoyl)-3-piperidinyl)carbonyl)amino]-4-pentynoate (131a).** To a solution of **128** (800 mg, 1.63 mmol) in EtOAc (8 ml) was added 4 N HCl in EtOAc (4.08 ml, 16.3 mmol) at 0  $^\circ\text{C}$ , and the reaction mixture was stirred for 3 h at room

temperature. The precipitates were filtered, washed with Et<sub>2</sub>O and resolved in water, neutralized with saturated aqueous NaHCO<sub>3</sub> desalted by using the resin of HP-20 with isopropanol/H<sub>2</sub>O (1:1), then lyophilized to give **131a** (536 mg, 84%) as an amorphous solid: IR (KBr) 3427, 3269, 3049, 2941, 2862, 2742, 1732, 1655 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 1.10 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.32-1.68 (m, 6H), 1.75-1.89 (m, 3H), 2.23-2.54 (m, 3H), 2.59-3.14 (m, 6H), 3.23-3.30 (m, 3H), 3.37-4.19 (m, 2H), 4.03 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.76-4.86 (m, 1H), 6.30 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 6.43-6.57 (m, 1H); MS (APCI) *m/z* 390 (M+H)<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>·2.7H<sub>2</sub>O: C, 57.57; H, 8.37; N, 9.59. Found: C, 57.89; H, 8.13; N, 9.19.

**Butyl (3*S*)-3-[(*(3R)*-1-[(*(2E)*-3-(4-piperidinyl)-2-propenoyl]-3-piperidinyl)carbonyl)amino]-4-pentynoate (131b).** This compound was prepared from **132** using a procedure similar to that employed for the preparation of **131a** (100%): <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 0.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H), 1.24-1.41 (m, 5H), 1.59-1.76 (m, 2H), 2.18-2.30 (m, 2H), 2.58-2.82 (m, 5H), 3.11-3.18 (m, 2H), 3.83 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.16-5.19 (m, 1H), 6.15 (d, *J* = 15.4 Hz, 1H), 6.25-6.40 (m, 1H); HRMS (ESI) *m/z* Calcd for C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (M+H)<sup>+</sup>: 418.2706, found: 418.2717.

**Pentyl (3*S*)-3-[(*(3R)*-1-[(*(2E)*-3-(4-piperidinyl)-2-propenoyl]-3-piperidinyl)carbonyl)amino]-4-pentynoate hydrochloride (131c).** This compound was prepared from **132** using a procedure similar to that employed for the preparation of **131a**. To the purified aqueous solution was added 1N HCl and lyophilized to give the product as a HCl salt (32%): IR (KBr) 3417, 3294, 3035, 2958, 2939, 2864, 2727, 1734, 1655 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 0.76-0.83 (m, 3H), 1.18-1.32 (m, 4H), 1.39-1.76 (m, 7H), 1.88-2.00 (m, 3H), 2.31-2.58 (m, 2H), 2.67 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 2.75-3.20 (m, 4H), 3.29-3.42 (m, 3H), 3.80-4.27 (m, 2H), 4.07 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 4.55-4.93 (m, 2H), 6.38 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 6.51-6.63 (m, 1H); MS (APCI) *m/z* 432 (M+H)<sup>+</sup>; Anal. Calcd for C<sub>24</sub>H<sub>37</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>HCl: C,

61.59; H, 8.18; N, 8.98. Found: C, 61.65; H, 8.42; N, 8.95.

**2-Phenylethyl (3S)-3-[(3R)-1-[(2E)-3-(4-piperidinyl)-2-propenoyl]-3-piperidinyl]carbonyl amino]-4-pentynoate hydrochloride (131d).** This compound was prepared from **134** using a procedure similar to that employed for the preparation of **131a** (83%): IR (KBr) 3028, 2945, 2864, 2804, 1736, 1651  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  1.21-1.75 (m, 11H), 2.30-2.35 (m, 2H), 2.61-3.10 (m, 8H), 2.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 3.17-3.29 (m, 2H), 3.66-3.84 (m, 1H), 4.24 (d,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 4.69-4.92 (m, 1H), 7.20-7.35 (m, 5H), 8.45-8.55 (m, 1H), 8.46-8.65 (br, 1H), 8.81-8.93 (br, 1H); HRMS (ESI)  $m/z$  Calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_4$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ : 466.2706, found: 466.2761.

**[(2,2-Dimethylpropanoyl)oxy]methyl (3S)-3-[(3R)-1-[(2E)-3-(4-piperidinyl)-2-propenoyl]-3-piperidinyl]carbonyl amino]-4-pentynoate trifluoroacetate (131e).** This compound was prepared from **135** using a procedure similar to that employed for the preparation of **131a**. Crude product was purified by preparative HPLC and lyophilized to give **131e** as TFA salt (81%): IR (KBr) 3373, 3049, 2981, 2943, 2870, 2536, 1757, 1674, 1659, 1601  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  1.19 (s, 9H), 1.46-1.86 (m, 6H), 1.93-2.11 (m, 3H), 2.39-2.66 (m, 2H), 2.77 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H), 2.90-2.95 (m, 2H), 3.00-3.30 (m, 4H), 3.40-3.52 (m, 3H), 3.90-4.13 (m, 2H), 5.78 (s, 2H), 6.45 (d,  $J = 15.5$  Hz, 1H), 6.64 (dd,  $J = 15.5, 6.2$  Hz, 1H); MS (APCI)  $m/z$  476 ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$ .

### 3.10.2. Pharmacokinetic Studies.

Following overnight fast animals (rats, dogs, or monkeys) in the oral group were administered a single dose of compound. Animals in the intravenous group received a single intravenous dose. All blood samples were collected from the jugular vein into heparinized Vacutainer tubes. Blood



samples from oral group were collected at 0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, and 12.0 h post-dose. Blood samples from intravenous group were collected at 0, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, and 12.0 h post-dose. Plasma samples were analyzed for plasma concentration of compound using a HPLC assay.

## 第4章 総括

以上、著者は、血小板膜蛋白 GPIIb/IIIa とフィブリノゲンとの結合阻害を引き起こすメカニズムを有する新規な血小板凝集抑制剤を創出した。

GPIIb/IIIa は血漿蛋白フィブリノゲン  $\alpha$  鎖の  $\beta$ -ターン構造を有するアルギニン(R)-グリシン(G)-アスパラギン酸(D)残基を特異的に認識し、凝集を起こす。筆者はこのことに注目し、フィブリノゲンと拮抗する RGD  $\beta$ -ターンを模した非ペプチド性小分子 **50** の設計と合成を行った。その結果、この化合物 **50** は中程度の血小板凝集抑制作用を示すことを見出した。

先ず、**50** をプロトタイプとして、安全性の高い注射剤の創出を行った。この化合物の血小板凝集抑制作用の向上を目標として、**50** のカルボン酸  $\alpha$  位に種々の置換基を導入した結果、化合物 **61e** が高い血小板凝集抑制作用(IC<sub>50</sub>; 53 nM)を示した。犬出血延長作用実験では、この化合物 **61e** は血小板凝集を抑制しながら、出血時間の延長を伴わない安全な薬剤であることが判明した。

次に、経口剤を創出するため、プロトタイプ化合物 **50** のカルボン酸  $\beta$  位に種々の置換基

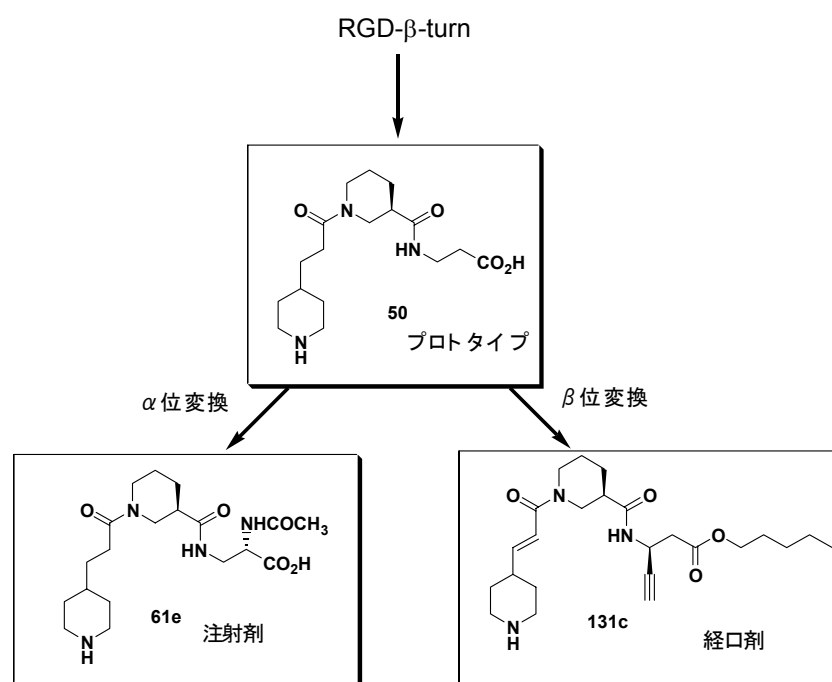
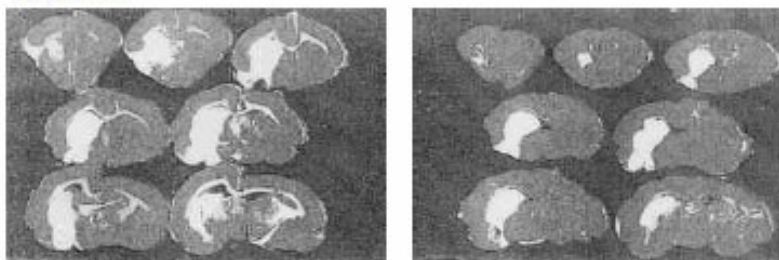


Figure 21.

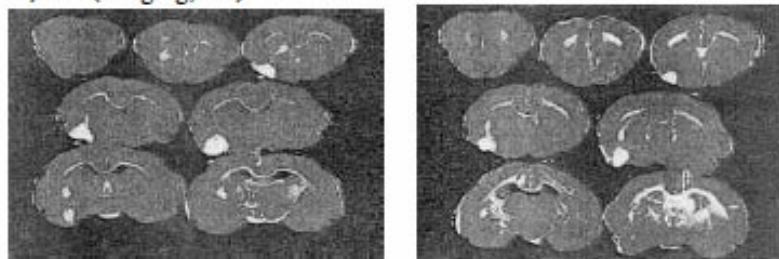
を導入した。その結果、カルボン酸β位がエチニル基で置換された誘導体が高い血小板凝集抑制作用(IC<sub>50</sub>; 38 nM)を示した。さらに、ブチルエステル基を持つプロドラッグ体 **131c** が経口吸収性に優れた化合物である事を見出した。

また、創出した薬剤が実際の症例モデルに対して有効であることを確認した。モルモット脳梗塞 PIT (photochemically-induced thrombosis) モデルにおける **61e** の薬効試験を行った。脳切片写真を Figure 22 に示す。PIT モデルは、血管内にローズベンガルを投与後、緑色光を照射すると血液中のローズベンガルが光反応を起こし、ラジカルを発生する。このラジカルにより血管内皮障害が起こり、緑色光照射部位に閉塞性血栓が形成する。中大脳動脈本幹に緑色光を照射することで、脳血栓を起こし、その結果、中大脳動脈梗塞ができる。脳切片画像の白い部分が、このモデルにおける脳梗塞を起こした部分である (Figure 22 (a))。

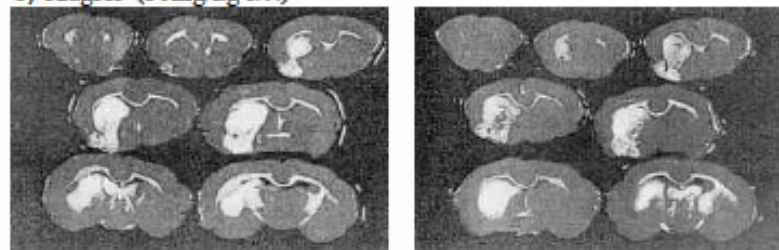
a) Vehicle



b) **61e** (1 mg/kg, i.v.)



c) ozagrel (30mg/kg i.v.)



**Figure 22.** The effect of **61e** and ozagrel against the PIT model in guinea pig.  
(モルモット脳梗塞PITモデルに対する**61e**及びオザゲレルの効果)  
測定匹数:各2

この実験モデルにおいて、化合物 **61e** 1 mg/kg を事前に静脈内投与した後に光照射を行った場合、明らかな脳梗塞の発生が抑えられているのが分かる(Figure 22 (b))。上市されている血小板凝集抑制剤であるオザグレルを対照群として用いた場合を Figure 22 (c) に示した。30 mg/kg でオザグレルを静脈内投与した後に、光照射を行ったが、脳梗塞の発生は食い止められていない。すなわち、**61e** は、薬効面でも明らかに既存の血小板凝集抑制剤との顕著な有効性の差が見られることが分かった。

化合物 **61e** は、現在開発番号 FK419 という名称で Phase I 段階にある。既存の血小板凝集抑制剤に付随する問題点を克服した優れた薬効と出血傾向の少ない利点を有する新しい血小板凝集抑制剤として位置づけられる。この注射剤の臨床実験で臨床有効用量が設定され次第、経口剤 **131c** も臨床段階に組み込む予定にしている。経口剤 **131c** (研究番号 FR184764) は、将来、バルーンによる血管狭窄部治療(PTCA)、狭窄部位へのステント挿入手術の後の再狭窄防止用、あるいは抹消血管障害 (バジュー病) を適応症として開発する計画である。

今後、これら 2 剤が上市されるまでには、健常人での薬剤の安全性試験、血中動態試験 (Phase I 試験)、患者さんへの投与による薬剤の有効性と血中動態からの用量決定(Phase II 試験)、様々な状況下の患者さんへの投与や既存薬剤との比較試験 (Phase III 試験)を経なければならず、まだ上市への道のりは長い。少なくともヒトでの有効性と安全性までは早急に確認したい。また経口剤 FR184764 (**131c**) もヒトでの経口吸収性がどのような値を示すかも将来確認すべき課題である。

また薬剤生産コスト低減化の面からも、まだ克服しなければいけない問題点がある。創出薬剤 FK419 (**61e**)、FR184764 (**131c**)は何れも不斉炭素を 2 ヶ所有している。特に 2 剤共通のニペコチン酸部分、及び経口剤 FR184764 (**131c**)のエチニル基置換不斉中心を有する  $\beta$ -アミノ酸部位は光学分割法により現段階では合成しており、理論上最大でも光学分割収率は 50%を超えることができない。すなわち半分以上が不要なものとして廃棄されていることになる。このことが高コストの原因の一つであると考えている。今後は、これら不斉中心を構築するための不斉合成法の開発、または光学分割法の効率化 (不要な光学異性体のラセミ化法構築による、光学分割原料のリサイクル化法開発など) を検討せねばならず、

また全合成までの工程数簡略化による総収率向上も目指さねばならない。この様に上市までには越えなければならないハードルは多くあるが、これら薬剤が少しでも早く上市され、血栓症に苦しむ患者が救われる日が一日でも早く来ることを切望する。

## 参考文献

1. 厚生労働省大臣官房統計情報部 人口動態統計 (2001)
2. (a) Scharf, R. E.; Harker, L. A. *Blut* **1987**, *55*, 131; (b) Fitzgerald, D. J.; Roy, L.; Catella, F.; Fitzgerald, G. A. *N. Engl. J. Med.* **1986**, *315*, 983.
3. 血小板の分子薬理—基礎と臨床 日高弘義 編著 講談社サイエンティフィック
4. 医療薬 日本医薬品集 第27報 2004, pp38. (財) 日本医薬品情報センター
5. 医療薬 日本医薬品集 第27報 2004, pp507. (財) 日本医薬品情報センター
6. 医療薬 日本医薬品集 第27報 2004, pp1272. (財) 日本医薬品情報センター
7. 末廣 謙 最新医学 **2000**, *55*, 216.
8. (a) 芦田伸一郎 ファルマシア **1992**, *28*, 255. (b) 脂質と血栓の医学、止血機構 <http://hobab.fc2web.com/sub2-siketsukikou.htm>.
9. (a) Fujimoto, T.; Hawiger, J.; *Nature* **1982**, *297*, 154; (b) Plow, E. F.; Pierschbacher, M. D.; Rouslahti, E.; Marguerie, G. A.; Ginsberg, M. H. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1985**, *82*, 8057 (c) 藤村吉博 KEYWORD 1998-2000 血液 pp194. 先端医学社
10. (a) Plow, E. F.; D'Souza, S. E.; Ginsberg, M. H.; *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* **1992**, *18*, 324; (b) 片桐康博 実験医学 **1992**, *10*, 1382.
11. (a) Plow, E. F.; Pierschbacher, M. D.; Ruoslahti, E.; Marguerie, G. A.; Ginsberg, M. H.; *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **1985**, *82*, 8057; (b) 松下 正 最新医学 **2000**, *55*, 183.
12. (a) Bennet, J. S.; Shattil, S. J.; Power, J. W.; Gartner, T. K. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 12948; (b) Pytela, R.; Pierschbacher, M. D.; Ginsberg, M. H.; Plow, E. F.; Ruoslahti, E. *Science* **1986**, *231*, 1559; (c) Peerschke, E. I.; Zucker, M. B.; Grant, R. A.; Egan, J. J.; Johnson, M. M. *Blood* **1980**, *55*, 841; (d) 尾崎 由基夫 最新医学 **2000**, *55*, 183.
13. 池田 康夫 KEYWORD 1998-2000 血液 pp126. 先端医学社
14. 丸山 征郎 医学のあゆみ **1993**, *167*, 484.
15. (a) Kato, Y.; Kita, Y.; Hirasawa-Taniyama, Y.; Nishio, M.; Mihara, K.; Ito, K.; Yamanaka, T.; Seki, J.; Miyata, S.; Mutoh, S. *Eur. J. Pharm*, **2003**, *473*, 163; (b) Kato, Y.; Kita, Y.; Nishio,

- M.; Hirasawa, Y.; Ito, K.; Yamanaka, T.; Motoyama, Y.; Seki, J. *Eur. J. Pharm*, **1999**, *384*, 197.
16. (a) 池田 康夫 最新医学 **2000**, *55*, 235; (b) 矢野 信也, 増保 安彦 医学のあゆみ **1994**, *169*, 117; (c) 尾島 巖, 董 慶, Chakravary, S. 有機合成化学協会誌, **1994**, *52*, 413.
17. Doolittle, R. F. *Annu. Rev. Biochem.* **1984**, *53*, 195.
18. (a) Wilmot, C. M.; Thornton, J. M. *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 221; (b) Crawford, J. L.; Lipscomb, W. N.; Schellman, C. G. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **1973**, *70*, 538; (c) Fisher, M. J.; Gunn, B.; Harms, C. S.; Kline, A. D.; Mullaney, J. T.; Nunes, A.; Scarborough, R. M.; Skelton, M. A.; Um, S. L.; Utterback, B. G.; Jakubowski, J. A. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2085; (d) Fisher, M. J.; Gunn, B. P.; Harms, C. S.; Kline, A. D.; Mullaney, J. T.; Scarborough, R. M.; Skelton, M. A.; Um, S. L.; Utterback, B. G.; Jakubowski, J. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 2537.
19. Hawiger, J.; Kloczewiak, M.; Bednarek, M. A.; Timmons, S. *Biochemistry* **1989**, *28*, 2909.
20. Marguerie, G. A.; Plow, E. F.; Edgington, T. S.; *J. Biol. Chem.* **1979**, *254*, 5357.
21. For reviews; see (a) Agah, R.; Plow, E. F.; Topol, E. J. *Platelets* **2002**, 769; (b) Scarborough, R. M.; Gretler, D. D. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 3454; (c) Mousa, S. A. *Drug Discovery Today* **1999**, *4*, 552, and references cited therein.
22. (a) Topol, E. J.; Byzova, T. V.; Plow, E. F.; *Lancet* **1999**, 353, 227; (b) Egbertson, M. S.; Chang, C. T.-C.; Duggan, M. E.; Gould, R. J.; Halczenko, W.; Hartman, G. D.; Laswell, W. L.; Lynch, Jr. J. J.; Lynch, R. J.; Manno, P. D.; Naylor, A. M.; Prugh, J. D.; Ramjit, D. R.; Sitko, G. R.; Smith, R. S.; Turchi, L. M.; Zhang, G. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2537; (c) Chung, J. Y. L.; Zhao, D.; Hughes, D. L.; Grabowski, E. J. J. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 5767; (d) Duggan, M. E.; Naylor-Olsen, A. M.; Perkins, J. J.; Anderson, P. S.; Chang, C. T.-C.; Cook, J. J.; Gould, R. J.; Ihle, N. C.; Hartman, G. D.; Lynch, J. J.; Lynch, R. J.; Manno, P. D.; Schaffer L. W.; Smith, R. L. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3332.
23. (a) Creighton, C. J.; Leo, G. C.; Du, Y.; Reitz, A. B. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *12*, 4375; (b) Bach, II, A. C.; Espina, J. R.; Jackson, S. A.; Stouten, P. F. W.; Duke, J. L.; Mousa, S. A.;

- DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 293; (c) Virgilio, A. A.; Bray, A. A.; Zhang, W.; Trinh, L.; Snyder, M.; Morrissey, M. M.; Ellman, J. A. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 6635
24. The synthesis of racemic 7-membered cyclic  $\beta$ -amino acid derivatives from  $\epsilon$ -caprolactam has been reported; see (a) Lee, D. L.; Morrow, C. J.; Rapoport, H. *J. Org. Chem.* **1974**, *39*, 893; (b) Krogsgaard-Larsen, P.; Hjedts, H. *Acta Chem. Scand.* **1976**, *B 30*, 884.
25. (a) Liu, M.; Sibi, M. P. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7991. (b) Gardiner, J.; Anderson, K. H.; Downard, A.; Abell, A. D. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 3375. (c) Abell, A. D.; Gardiner, J. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 3663. (d) Fustero, S.; Bartolomé, A.; Sanz-Cervera, J. F.; Sánchez-Roselló, M.; Soler, J. G.; Ramírez de Arellano, C.; Fuentes, A. S. *ibid.* **2003**, *5*, 2523. (e) Chippindale, A. M.; Davies, S. G.; Iwamoto, K.; Parkin, R. M.; Smethurst, C. A. P.; Smith, A. D.; Rodriguez-Solla, H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3253.
26. (a) Yamanaka, T.; Ohkubo, M.; Kato, M. Nishi, A.; Kawamura, Y. Hosokawa, T. *Synlett.* **2005**, 631. (b) Yamanaka, T.; Ohkubo, M.; Kato, M.; Ogura, T.; Kawamura, Y.; Hosokawa, T. XXIst International Conferences on Organometallic Chemistry (2004, Vancouver). Abstract pp111. **143**; (c) 山中 敏夫, 大久保 充, 加藤 眞行, 川村 泰史, 西 顕憲, 細川 隆弘 日本化学会第 85 春季年会 (2005, 神奈川) 予稿集 2PC-149; (d) Ohkubo, M.; Kuroda, S.; Nakamura, H.; Minagawa, M.; Aoki, T.; Harada, K.; Seki, J. International Patent WO 0160813.
27. (a) Trnka, T. M.; Grubbs, R. H. *Acc. Chem. Res.* **2001**, *34*, 18; (b) Furstner, A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 3021; (c) Connom, S. J.; Blechrt, S. *ibid.* **2003**, *42*, 1900.
28. van Benthem, R. A. T. M.; Michels, J. J.; Hiemstra, H.; Speckamp, W. N. *Synlett* **1994**, 368.
29. (a) Hong, S. H.; Day, M. W.; Grubbs, R. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 7414; (b) Schmidt, B. *Synlett* **2004**, 1541.
30. Evans, D.A.; Ennis, M. D.; Mathre, D. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*, 1737.
31. (a) Hosokawa, T.; Yamanaka, T.; Itotani, M.; Murahashi, S.-I. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6159; (b) Hosokawa, T.; Yamanaka, T.; Murahashi, S.-I. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 117.
32. Evans, D. A.; Britton, T. C.; Ellman, J. A. *Tetrahedron Lett.* **1987**, *28*, 6141.



33. Hashimoto, N.; Aoyama, T.; Shioiri, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1981**, *29*, 1475.
34. Garro-Helion, F.; Merzouk, A.; Guibé, F. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6109.
35. Sibi, M. P.; Deshpande, P. K. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **2000**, 1461.
36. (a) Aoki, T.; Cox, D.; Senzaki, K.; Seki, J.; Tanaka, A.; Takasugi, H.; Motoyama, Y. *Thromb. Res.* **1996**, *81*, 439.
37. Magnus, P.; Thurston, L. S. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 1166.
38. (a) Tripos Associates, 1699 South Hanley Rd., Suite 303, St.Louis, MO 63144; (b) Okumura, K.; Shimazaki, T.; Aoki, Y.; Yamashita, H.; Tanaka, E.; Banba, S.; Yazawa, K.; Kibayashi, K.; Banno, H. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 4036.
39. (a) Horwitz, P. A.; Berlin, J. A.; Sauer, W. H.; Laskey, W. K.; Krone, R. J.; Kimmel, S. E. *Am. J. Cardiol.* **2003**, *91*, 803; (b) CAPTURE Investigators. *Lancet* **1997**, *349*, 1429; (c) EPIC Investigators. *N. Engl. J. Med.* **1994**, *330*, 956; (c) 池田 康夫 最新医学 **2000**, *55*, 183.
40. Zhang, L.; Kauffman, G. S.; Pesti, J. A.; Yin, J. *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 6918.
41. (a) Yamanaka, T.; Ohkubo, M.; Kuroda, S.; Nakamura, H.; Takahashi, F.; Aoki, T.; Mihara, K.; Seki, J.; Kato, M. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *in press*; (b) Mihara, K.; Aoki, T.; Moriguchi, A.; Yamamoto, H.; Maeda, M.; Tojo, N.; Yamanaka, T.; Ohkubo, M.; Matsuoka, N.; Seki, J.; Mutoh, S. *Drug Dev. Res.* **2004**, *61*, 233; (c) Moriguchi, A.; Mihara, K.; Aoki, T.; Maeda, M.; Tojo, N.; Nobuya, M.; Mutoh, S. *Eur. J. Pharm.* **2004**, *498*, 179; (d) Ohkubo, M.; Takahashi, F.; Yamanaka, T.; Sakai, H.; Kato, M. International Patent WO 9733869.
42. (a) Davis, S. G.; Ichihara, O. *Tetrahedron Asymmetry* **1991**, *3*, 183; (b) Davis, S. G.; Garrido, N. M.; Ichihara, O.; Walters, I. A. S. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1993**, 1153; (c) Davis, S. G.; Walters, I. A. S. *J. Chem. Soc., Perkin Trans I.* **1994**, 1129.
43. Jefford, C. W.; Wang, J. *Tetrahedron Letters* **1993**, *34*, 1111.
44. (a) Salzmann, T. N.; Ratcliffe, R. W.; Christensen, B. G.; Bouffard, F. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 6163; (b) Labia, R.; Morin, C. *Chem. Lett.* **1984**, 1007.
45. Okazoe, T.; Hibino, J.-I.; Takai, K.; Nozaki, H.; *Tetrahedron Letters* **1985**, *45*, 5581.
46. Boys, M. L.; *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 3449.

47. (a) Yamanaka, T.; Ohkubo, M.; Takahashi, F.; Kato, M. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2843.
48. (a) Nagai, H.; Shiozawa, T.; Achiwa, K.; Terao, Y. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2227; (b) *idem, ibid.* **1993**, *41*, 1933.
49. Purchased from Amano Enzyme Co.; Ltd.
50. Ohkubo, M; Takahashi, F.; Yamanaka, T.; Sakai, H.; Kato, M. International Patent WO 9508536.

## 研究業績

### 論文

- (1) Toshio Yamanaka, Mitsuru Ohkubo, Satoru Kuroda, Hideko Nakamura, Fumie Takahashi, Toshiaki Aoki, Kayoko Mihara, Jiro Seki, and Masayuki Kato. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of Potent GPIIb/IIIa Antagonists: Discovery of FK419. *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 4343-4352.
- (2) Toshio Yamanaka, Mitsuru Ohkubo, Masayuki Kato, Yasufumi Kawamura, Akinori Nishi, and Takahiro Hosokawa. An Efficient Synthesis of Cyclic  $\beta$ -Amino Acid Derivatives as  $\beta$ -Turn Mimetics. *Synlett* **2005**, 631-634.
- (3) Toshio Yamanaka, Mitsuru Ohkubo, Fumie Takahashi, and Masayuki Kato. An Efficient Synthesis of the Orally-Active GpIIb/IIIa Antagonist FR184764. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2843-2845.
- (4) Takahiro Hosokawa, Toshio Yamanaka, Motohiro Itotani, and Shun-Ichi Murahashi. Palladium(II)-Catalyzed Asymmetric Acetalization of Alkenes. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 6159-6167.
- (5) Takahiro Hosokawa, Toshio Yamanaka, and Shun-Ichi Murahashi. Palladium(II)-Catalyzed Asymmetric Acetalization of Alkenes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1993**, 117-118.
- (6) Kayoko Mihara, Toshiaki Aoki, Akira Moriguchi, Hiroko Yamamoto, Maeda Masashi, Nobuteru Tojo, Toshio Yamanaka, Mitsuru Ohkubo, Nobuya Matsuoka, Jiro Seki, and Seitaro Mutoh. Characterization of the Anti-Platelet Actions of FK419, a Novel Non-Peptide Antagonist of Platelet GPIIb/IIIa. *Drug Dev. Res.* **2004**, *45*, 233-241.
- (7) Yasuko Kato, Yasuhiro Kita, Yoshimi Hirasawa-Taniyama, Mie Nishio, Kayoko Mihara, Kiyotaka Ito, Toshio Yamanaka, Jiro Seki, Susumu Miyata, and Seitaro Mutoh. Inhibition of

Arterial Thrombosis by a Protease-Activated Receptor 1 Antagonist, FR171113, in the Guinea Pig. *Eur. J. Pharm*, **2003**, *473*, 163-169.

(8) Yasuko Kato, Yasuhiro Kita, Mie Nishio, Yoshimi Hirasawa, Kiyotaka Ito, Toshio Yamanaka, Yukio Motoyama, and Jiro Seki In Vitro Antiplatelet Profile of FR171113, a Novel Non-Peptide Thrombin Receptor Antagonist. *Eur. J. Pharm*, **1999**, *384*, 197-202.

#### 学会発表

(1) Toshio Yamanaka, Mitsuru Ohkubo, Masayuki Kato, Toshihiko Ogura, Yasufumi Kawamura, and Takahiro Hosokawa Synthesis of Cyclic  $\beta$ -Amino Acid Derivatives as  $\beta$ -Turn Mimetics. XXIst International Conferences on Organometallic Chemistry (2004, Vancouver). Abstract pp111. **143**.

(2) 山中 敏夫, 大久保 充, 加藤 眞行, 川村 泰史, 西 顕憲, 細川 隆弘  $\beta$ -ターン構造を有する RGD ペプチドを模した光学活性環状  $\beta$ -アミノ酸誘導体の合成 日本化学会第 85 春季年会 (2005, 神奈川) 予稿集 2PC-149.

(3) 大久保 充, 山中 敏夫, 高橋 史江, 加藤 眞行, 関 二郎, 坂根 和夫, 田中 洋和 新規 GpIIb/IIIa レセプター拮抗剤の合成 日本薬学会第 117 年会 (1997, 東京) 予稿集 pp74. 27 【P1】 10-15.

#### 特許

(1) Mitsuru Ohkubo, Fumie Takahashi, Toshio Yamanaka, Hiroyoshi Sakai, and Masayuki Kato. Carboxamide Derivatives of Pyrrolidine, Piperidine and Hexahydroazepine for the Treatment of Thrombosis Disorders. WO 9733869 (1997).

(2) Mitsuru Ohkubo, Fumie Takahashi, Toshio Yamanaka, Hiroyoshi Sakai, and Masayuki Kato. *N*-(3-Piperidinylcarbonyl)-beta-alanine Derivatives as PAF Antagonists. WO 9508536 (1995).

## 謝 辞

本論文をまとめるにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました高知工科大学大学院 細川 隆弘 教授、榎本 恵一 教授、大濱 武 教授に心より感謝いたします。また論文審査委員として私の論文審査を行って頂きました高知工科大学大学院 古江 正興 教授、高知大学医学部 西岡 豊 教授、高知工科大学大学院 小廣 和哉 助教授に深く感謝いたします。

本研究にあたり常に有益な御助言、御指導を頂き、また活発な議論を致しましたアステラス製薬（株）化学研究所創薬化学第一研究室長 大久保 充 博士に深く感謝いたします。

誘導体の合成をお手伝い頂きました同化学研究所主管研究員 黒田 聡 博士、同創薬推進研究所主任研究員 酒井 裕義氏、元化学研究所中村 英子氏に感謝いたします。また誘導体の合成、および高分解能マスペクトルを測定して頂きました同化学研究所 高橋 史江氏に感謝いたします。

薬理評価を行っていただきました同安全性研究所所長 関 二郎 博士、同薬理研究所主管研究員 青木 俊明 博士、同薬理研究所 三原 佳代子 博士に感謝いたします。

分子力場計算を行っていただきました同探索研究所主任研究員 村埜 賢司氏に感謝いたします。

薬物動態評価を行っていただきました同創薬推進研究所主任研究員 高村 不二子氏に感謝いたします。

鍵中間体合成のための新規反応開発研究にご協力くださいました高知工科大学大学院 小倉 俊彦 修士（現ヤンセンファーマ株式会社）同博士前期過程 2 年川村 泰史君、同 1 年 西 顕憲君に感謝いたします。

本学への留学の機会を与えてくださいましたアステラス製薬（株）化学研究所所長 塚本 紳一 博士、元藤沢薬品工業（株）化学研究所所長 加藤 眞行 博士、アステラス製薬（株）化学研究所副所長 太田 光昭 博士、同 三宅 宏 博士、アステラス製薬（株）研究推進部 松田 啓二 博士、化学研究所創薬化学第三研究室長 David Barrett 博士に厚く御礼申し上げます。

最後に私の研究生活を激励してくださいました妻 操、長女 晴楓、長男 智喜、父 和夫、母 順子に感謝いたします。