

スクアリン酸含有アミノ酸のペプチド化と機能  
(Studies on Peptide Analogs Bearing Squaric Acid-containing  
Amino Acids)

理学研究科

物質分子系専攻

平成二十七年

前田 健太郎  
(Kentaro Maeda)

## Studies on Peptide Analogs Bearing Squaric Acid-containing Amino Acids

Kentaro Maeda

### *abstract*

Incorporation of non-natural amino acids and peptide bond equivalents into peptides has been employed as a useful tool in medicinal chemistry. This method contributes to increase the stability of peptides toward enzymes and to control peptide conformation. In the laboratory where the author belongs,  $\alpha$ -amino squaric acid ( $\alpha$ -Asq) was developed as a novel amino acid analog.  $\alpha$ -Asq was synthesized from squaric acid. Squaric acid exhibits several unique properties, strong acidity, aromaticity, electron deficiency, metal chelating ability, and strong hydrogen bond formation. In addition, squaric acid diesters readily react with amines to give the chemically stable amide-like bonds. For these reasons, squaric acid has been studied extensively as a carboxylic acid equivalent. It was envisaged that  $\alpha$ -Asq could be employed for the flexible peptide incorporation and contribute to develop bioactive peptides, e.g. peptide ligands and peptidic protease inhibitors.

This thesis consists of 5 chapters. Chapter 1 describes the background of squaric acid, squaramide, and their application to organic chemistry and life science. Chapter 2 describes the incorporation of  $\alpha$ -substituted  $\alpha$ -Asqs (e.g. phenylalanine equivalent, SqPhe, and leucine equivalent, SqLeu) into insides and C-termini of peptides. This method allowed for the synthesis of two novel leu-enkephalin analogs. In addition, the synthesis of novel dimers and a trimer of  $\alpha$ -Asq is described. Chapter 3 describes the incorporation of  $\alpha$ -Asq into peptides by a solid-phase peptide synthesis (SPPS). The SPPS of  $\alpha$ -Asqs was achieved by the use of  $\alpha$ -Asq-containing dipeptide units. This method allowed for the synthesis of  $\alpha$ -Asq-containing peptide analog libraries. Bioactive evaluations of libraries and the proteolytic degradation study are also described. In chapter 4, the development of inhibitors of caspase-3, a well-known cysteine protease, using  $\alpha$ -Asq-containing peptides is described.  $\alpha$ -Asq could be employed to trap the active site thiol of caspase-3 due to the electron-deficient nature of squaric moiety in  $\alpha$ -Asq, it has been found inhibitory activity in  $IC_{50}$  value of 35 nM. Chapter 5 describes the enantioselective synthesis and the peptide induction of novel squaric acid derivatives as  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -amino acid analogs. In addition, the application to syntheses of caspase-3 inhibitors is described.

## 略語表

AA	$\alpha$ -amino acid
Ac	acetyl
AcOEt	ethyl acetate
AIBN	2,2'-azobisisobutyronitrile
Ala	alanine
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazolpropionic acid
aq.	aqueous solution
Ar	aryl
Arg	arginine
Asn	asparagine
Asp	aspartic acid
$\alpha$ -Asq	$\alpha$ -amino sugaric acid
Bn	benzyl
Boc	<i>tert</i> -butoxycarbonyl
br	broad (spectral)
<i>n</i> -Bu	<i>n</i> -butyl
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butyl
<i>sec</i> -Bu	<i>secondary</i> -butyl
calcd	calculated
Cbz	benzyloxycarbonyl
CHO	Chinese hamster ovary
Cys	cysteine
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-ene
DEPBT	3-(diethoxyphosphoryloxy)-1,2,3-benzotriazin-4(3 <i>H</i> )-one
DIEA	diisopropylethylamine
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMP	Dess-Martin periodinane
DMPU	1,3-dimethyl-3,4,5,6-tetrahydro-2(1 <i>H</i> )-pyrimidinone
DMSO	Dimethyl sulfoxide
eq.	equivalent
Et	ethyl
FAB	fast atom bombardment
Fmoc	9-fluorenylmethoxycarbonyl
Glu	glutamic acid
Gly	glycine

HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate
His	histidine
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HPLC	high-performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectrometry
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
Ile	isoleucine
IR	infrared
IUPAC	international union of pure and applied chemistry
<i>J</i>	coupling constant (in NMR)
KA	kainic acid
LDA	lithium diisopropylamide
Leu	leucine
LHMDS	lithium hexamethyldisilazide
LTMP	lithium tetramethylpiperidide
lit.	literature
Lys	lysine
Me	methyl
MS	mass spectrometry
<i>n</i> -	normal
NBS	N-bromosuccinimide
NICS	Nucleus-independent chemical shift
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NMR	nuclear magnetic resonance
NOE	nuclear Overhauser effect
NOESY	nuclear Overhauser and exchange spectroscopy
Nu	nucleophile
Ph	phenyl
Phe	phenylalanine
<i>pK</i> <sub>a</sub>	negative logarithm of equilibrium for association
<i>i</i> -Pr	isopropyl
Pro	proline
quant.	quantitative yield
RP-HPLC	reverse phase-high-performance liquid chromatography
rt	room temperature
sat.	saturated

Ser	serine
s.m.	starting material
Su	succinimide
Sq	Squaryl
SqA	squaric acid
<i>t(tert)</i>	tertiary
TBAI	tetrabutylammonium iodide
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TFA	trifluoroacetic acid
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin-layer chromatography
Trp	tryptophan
Tyr	tyrosine
Val	valine

## 目次

第一章 序論	p. 1
1-1 スクアリン酸、スクアラミドとその応用	
1-2 $\alpha$ -アミノスクアリン酸 ( $\alpha$ -Asq) の研究経過	
References	
第二章 $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成	p. 24
2-1 $\alpha$ -置換- $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成計画と検討	
2-2 エンケファリンアナログの合成	
2-3 $\alpha$ -Asq ダイマーおよびトリマーの合成	
Experimental section	
References	
第三章 固相合成による $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成	p. 79
3-1 固相合成による SqGly のペプチド化	
3-2 固相合成による SqPhe のペプチド化	
3-3 $\alpha$ -Asq 含有ペプチドアナログライブラリーの構築と生物活性試験	
3-4 消化酵素に対する抵抗性評価	
Experimental section	
References	
第四章 $\alpha$ -Asq を利用した Caspase-3 阻害剤の開発	p. 111
4-1 Caspase 阻害剤	
4-2 $\alpha$ -Asq 含有 Caspase-3 阻害剤の合成	
4-3 Caspase-3,7 に対する阻害活性試験	
Experimental section	
References	
第五章 $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸類の合成とペプチド化	p. 145
5-1 $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸の合成	
5-2 Caspase-3 阻害剤としての利用	
Experimental section	
References	
まとめ	
Appendix	

研究業績  
謝辭

## 第一章 序論

ペプチドは、生命の維持・機能を担う重要な生体物質の一つである。体内のペプチドリガンドやタンパク質の部分構造を切り取ったアミノ酸配列を基にした薬剤は、標的とする受容体や酵素に対する選択性が高く、副作用が少ないことが見込まれる。しかしながら、ペプチドは消化酵素によって容易に加水分解を受けるため、経口投与できないという欠点がある。また、ペプチドの三次構造は標的（受容体、酵素）に対する結合に重要に関わっているため、ペプチドのコンフォメーションの多様性は、かえって薬剤開発の妨げとなりえる。これらの問題を解決するために、ペプチド結合を非天然型のペプチド結合に置き換えたペプチド結合等価体の開発が活発になされてきた。これにより、ペプチドの消化酵素に対する安定化や、ペプチドの三次構造を制御することが可能となった。

これまでに Figure 1-1 に示したような様々なペプチド結合等価体が開発されてきた。<sup>1-12)</sup> 例えば、ペプチド結合（アミド結合）をスルホンアミドリ<sup>1)</sup>やホスホンアミド<sup>2)</sup>に置換したもののや、ペプチド結合を炭素鎖で模倣したもの<sup>4)7)</sup>などが知られている。しかしながら、スルホンアミドやホスホンアミドは十分な安定性を有しておらず、酸性条件下で加水分解を受けやすいため、合成・精製に慎重を要し、他のペプチド結合等価体も合成に困難を要するものや導入できる置換基が限られるものも少なくない。これらの理由から、安定かつ種々の置換基を導入できる新規なペプチド結合等価体の開発が求められている。

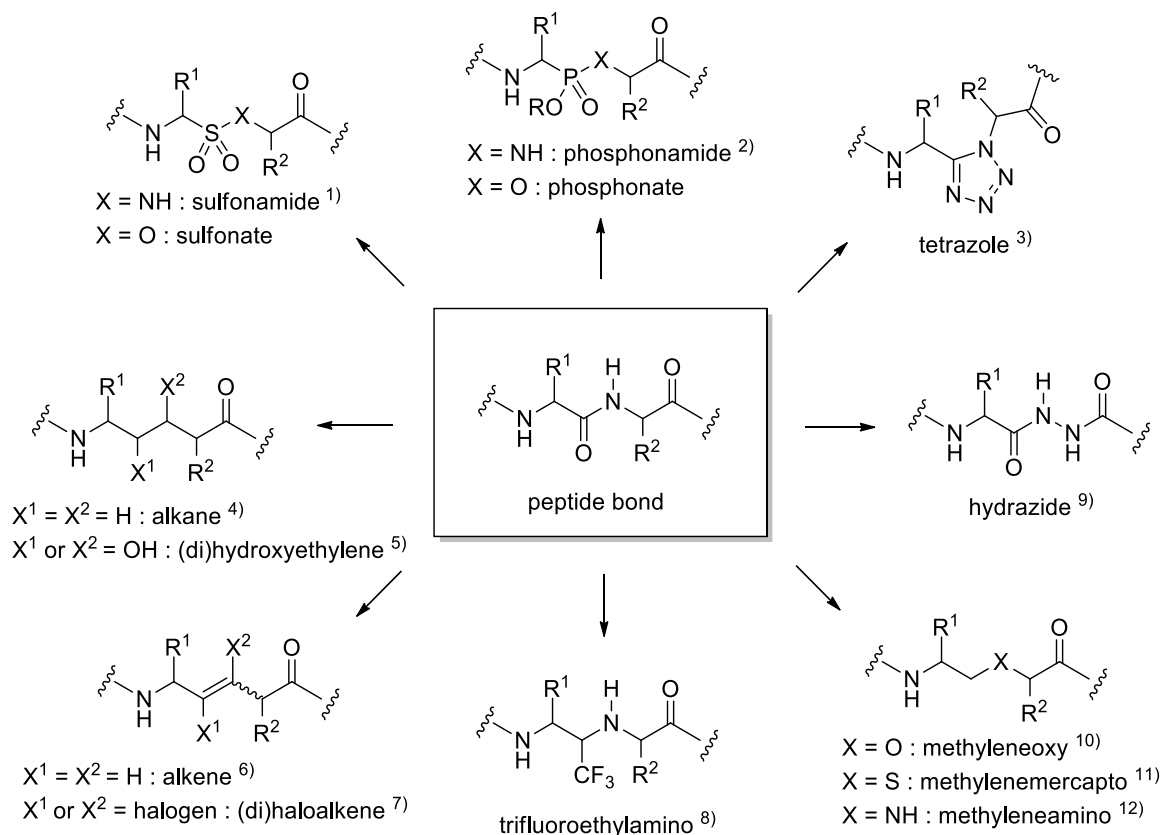
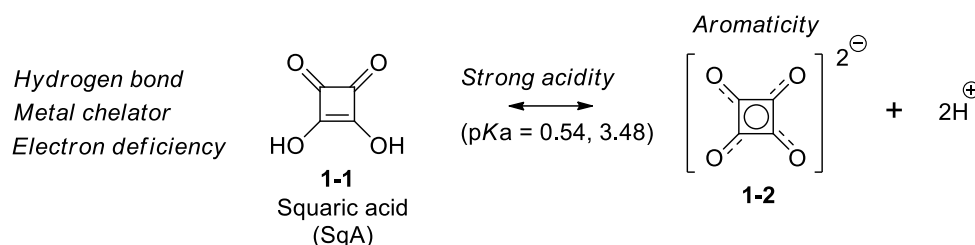


Figure 1-1. Peptide isosteres.



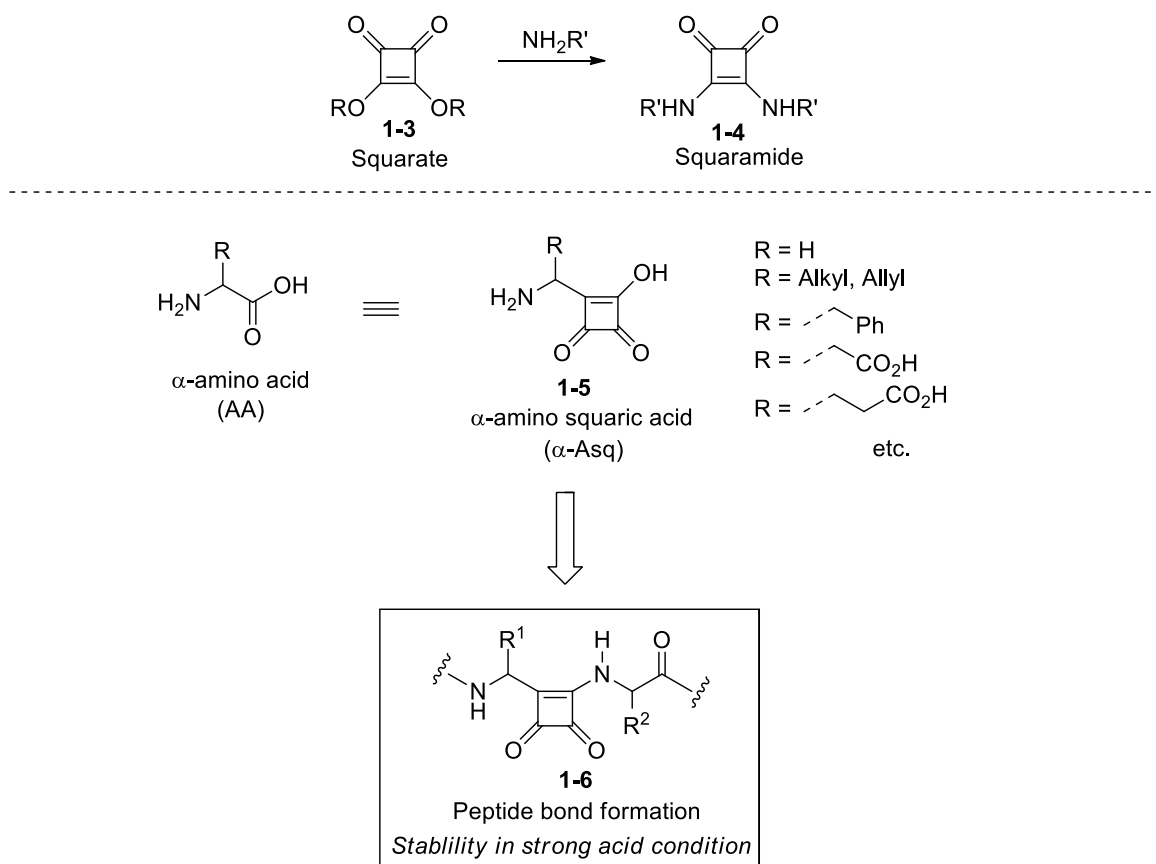
筆者の所属する研究室は、新規なペプチド等価体の開発に向けて、スクアリン酸 **1-1** に着目した(Figure 1-2)。

スクアリン酸 (IUPAC 名 : 3,4-ジヒドロキシ-3-シクロブテン-1,2-ジオン, SqA) **1-1** は歪んだシクロブテン環上に 2 つのカルボニル基と 2 つの水酸基が共役系を介して配置されたオキソカーボン酸の一種である。1959 年に Cohen らによって初めて合成されて以来、<sup>13)</sup> その物性や反応性について様々な研究がなされてきた (Figure 1-2)。**1-1** からプロトンが 2 個解離したジアニオン **1-2** の陰イオンは 4 つの等価な酸素原子上に非局在化し、安定化される。またジアニオン **1-2** は Hückel 則を満足し、芳香族性を示す。<sup>14, 15)</sup> この性質から、SqA **1-1** は容易にプロトンを放出し、トリフルオロ酢酸 ( $pK_a = 0.3$ ) に匹敵する強い酸性を示す ( $pK_{a1} = 0.54$ ,  $pK_{a2} = 3.58$ )。その他に、水分子よりも強固な水素結合の形成や、金属錯体の形成、求核種と容易に反応する求電子的性質といった諸性質を有することから、有機合成化学、医薬品化学、ケミカルバイオロジー、機能性材料科学などの分野で幅広く利用されている。<sup>16)</sup>



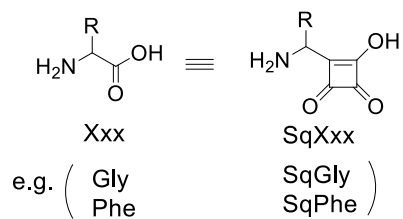
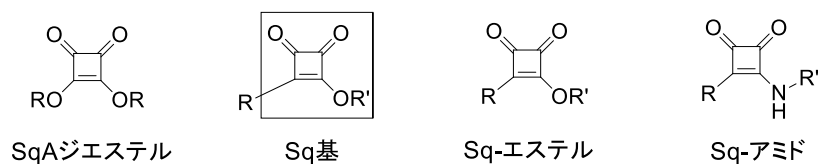
**Figure 1-2.** Squaric acid and its physical properties.

SqA **1-1** は平面共役構造と強酸性を示すことからカルボン酸の等価体として見なすことができる。また、SqA の高い求電子的性質からエステル体 **1-3** はアミン類と容易に反応してアミド結合を形成し、スクアラミド **1-4** を与える(Figure 1-3)。これらの点に着目し、筆者の所属する研究室ではペプチド化可能な新規なアミノ酸アナログとして、 $\alpha$ -アミノスクアリン酸 ( $\alpha$ -Asq) **1-5** を開発した。<sup>17)</sup> **1-5** は  $\alpha$  位に種々の置換基を導入して合成できるため、置換基の役割が生物活性の発現に重要なペプチドのアナログ合成が可能である。また、スルホンアミドやホスホンアミドの場合とは異なり、 $\alpha$ -Asq **1-5** を導入したペプチドアナログ **1-6** は強力な酸性条件(30% HBr/AcOH)にも安定である。<sup>17)</sup> ペプチド内に  $\alpha$ -Asq を組み込めば、SqA の水素結合形成や金属錯体形成、UV 吸収特性などの機能を利用できると考えられ、従来にない切り口でペプチド科学の発展に貢献できると期待した。



**Figure 1-3.**  $\alpha$ -amino squaric acid.

注1) 以後、記述される下記の構造は以下のように略称する。



注2) 以後、ペプチドにおけるアミノ末端を N 末端、カルボキシ末端を C 末端と略称する。

注3) 以後、アミノ酸における最もアミノ基側を N 末端側、カルボキシ基側を C 末端側と略称する。

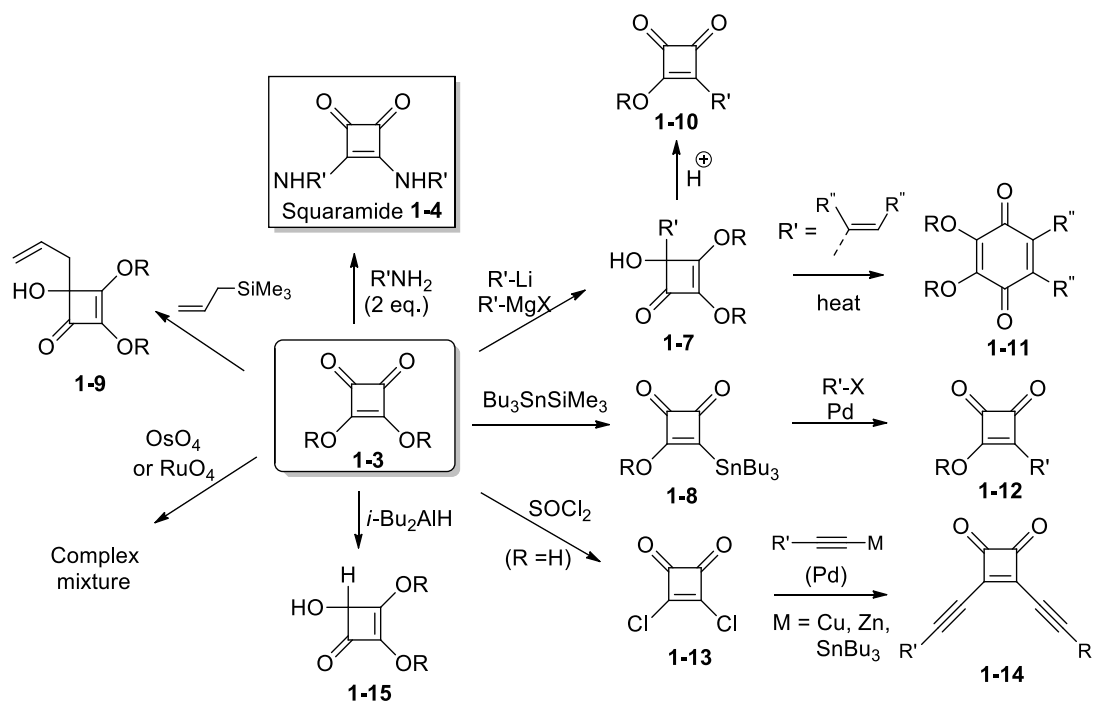
## 1-1. スクアリン酸、スクアラミドとその応用

### スクアリン酸の反応例

SqA はその高い求電子性と熱的に開環しやすい性質から、有機合成の分野で幅広く活用されている。<sup>18)</sup> その一例を Scheme 1-1 に示した。

SqA ジエステル **1-3** はヘテロ求核試薬と容易に反応し、1,4-付加脱離生成物を与える(**1-3** → **1-4**)。特にアミンとの反応によって得られるスクアラミド **1-4** は、安定な結合を形成する上、アミノ基を介して様々な置換基を容易に導入できることから、後述する様々な分野で応用されている。<sup>16)</sup> SqA への炭素-炭素結合形成反応は、**1-3** のカルボニル基への有機金属試薬やアリルシランを用いた求核付加反応(**1-3** → **1-7**, **1-3** → **1-9**)、<sup>19)</sup> 及び Stille カップリング反応(**1-8** → **1-12**)、<sup>20)</sup> クロロ体 **1-13** を用いた金属試薬とのカップリング反応(**1-13** → **1-14**)<sup>21)</sup> などが知られている。SqA への 1,2-付加生成物 (ヒドロキシシクロブテノン) **1-7** は酸処理によって、Sq 基へと変換することが可能である(**1-7** → **1-10**)と共に、置換基によっては加熱条件下で環拡大し、キノンやピリドンなどの合成に利用されている(**1-7** → **1-11**)。<sup>22)</sup>

またヒドリド還元剤を用いると 1,2-還元体 **1-15** を与える一方で、オスmium酸化やルテニウム酸化などの酸化条件には弱く、分解物を与えることがわかっている。

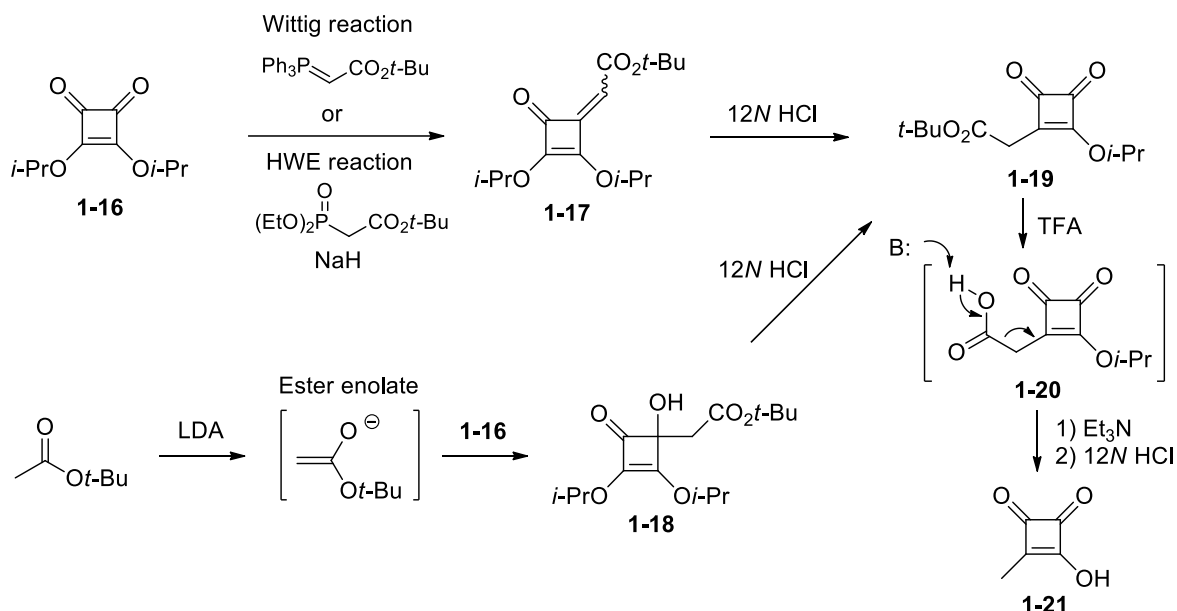


**Scheme 1-1.** Organic reactions of squaric acid.

#### ・ Wittig 反応およびエステルエノラートをを用いた炭素-炭素結合形成<sup>23)</sup>

著者の所属する研究室では、新規な SqA に対する炭素-炭素結合形成反応の開発により、スクアリル酢酸 **1-21** を合成した(Scheme 1-2)。SqA ジエステル **1-16** に対する Wittig 反応、Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) 反応および、酢酸エステルから発生させたエノラートの付

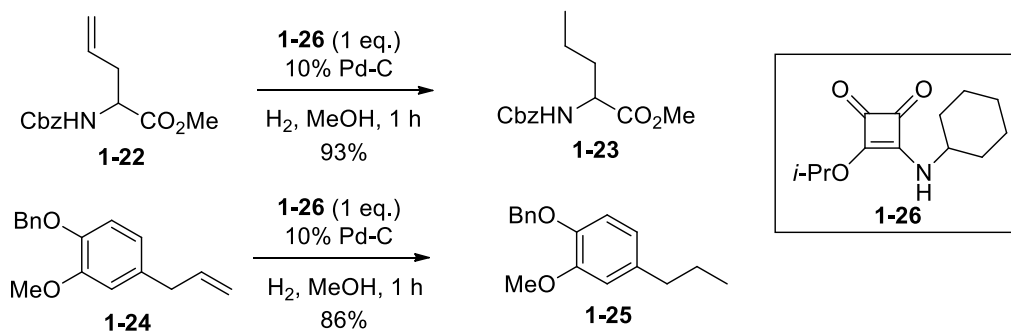
加反応によって、付加体 **1-17** および **1-18** を得た。**1-17** および **1-18** はそれぞれ塩酸処理により Sq-エステル **1-19** へと変換される。続く *tert*-ブトキシカルボニル基の除去は、Sq 基の電子不足な性質を利用した脱炭酸反応により行われた。すなわち **1-19** の *t*-Bu 基を TFA で除去して生じるカルボン酸 **1-20** に対し Et<sub>3</sub>N を作用させると脱炭酸反応が進行し、その後の加水分解により **1-21** へと導かれた。



**Scheme 1-2.**

・接触水素化における脱ベンジル化の触媒毒作用<sup>24)</sup>

SqA は接触水素化におけるベンジル基の脱保護において触媒毒作用を示す。品田らは SqA のこの性質を利用して、ベンジル基とオレフィンの両方を含む基質に対して、オレフィンのみを選択的に還元する接触水素化を報告している(Scheme 1-3)。Sq-エステルアミド **1-26** の存在下、アミノ基を Cbz 基で保護した **1-22** に対し Pd-C を用いた水素添加反応を行うと、オレフィン部のみが選択的に還元された生成物 **1-23** を 93% 収率で与えた。基質 **1-24** に対しても、Bn 基は除去されることなくオレフィンのみが選択的に還元され **1-25** を収率良く与えた。



**Scheme 1-3.**

## スクアラミドの水素結合の利用

スクアラミド **1-4** は水素原子供与体あるいは受容体と強固な水素結合を形成する。NICS法（核種非依存化学シフト法）を用いた芳香族性の調査によると、アンモニウムイオンおよびカルボキシレートと水素結合を形成したスクアラミド **1-27** は、水素結合していない **1-4** に比べて芳香族性が増加することが報告されている。<sup>25)</sup> この性質がスクアラミドの強い水素結合形成の要因であると考えられている(Figure 1-4, A)。スクアラミドは分子内においても水素結合を形成しやすい。スクアラミドの窒素上の孤立電子対は、シクロブテンを介して酸素原子上に共役しているため、アミドと同様にスクアラミドには **1-28~1-30** のような回転異性体が存在する(B)。ほとんどの場合において、置換基同士の立体障害を避けるため *anti/anti* 体 **1-28** として存在している。その一方で *N*-アシルスクアラミド **1-31** は *syn/anti* 体である。これは **1-31** のアシル基と逆側の NH プロトンの間で強固な水素結合を形成するためである(B)。

26)

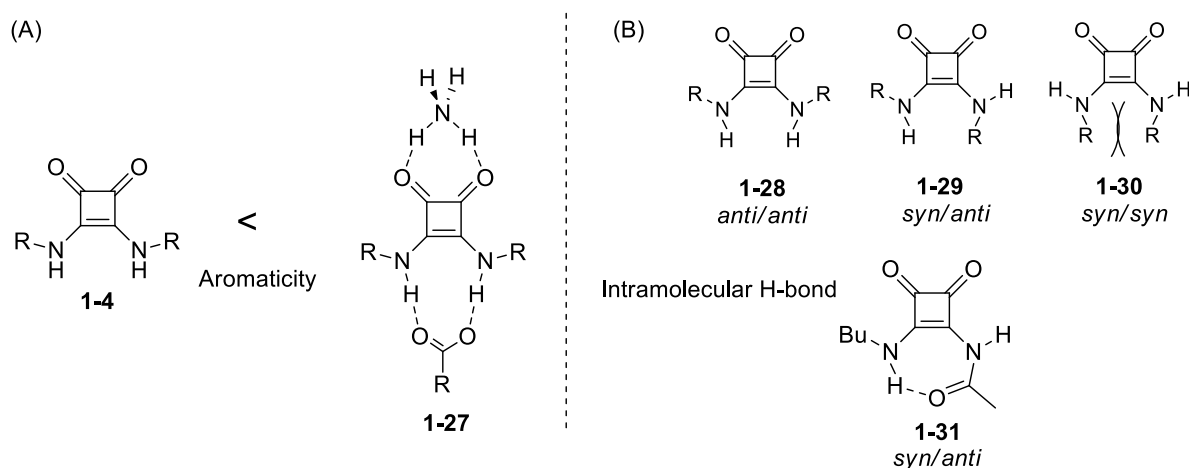
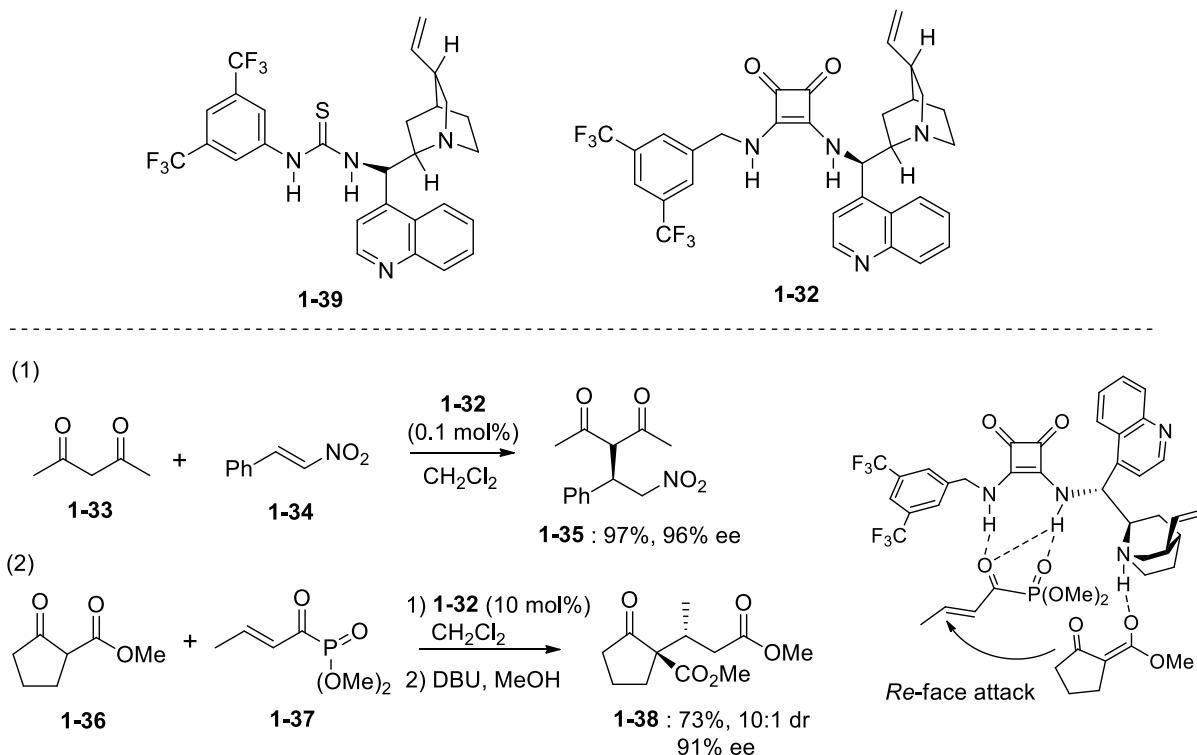


Figure 1-4. Hydrogen bonding of SqA and squaramide.

### ・スクアラミドキラル有機触媒

スクアラミドの強い水素結合は、キラル有機触媒として不斉合成に利用されている。よく知られたキラル有機触媒にはウレアやチオウレア触媒などがあり、水素結合供与体として求電子種に配位して固定し、付加反応に対する面選択性を生み出す。<sup>27)</sup> Rawal らはスクアラミドの強い水素結合とリジッドな骨格は、有機触媒として有意に働くと考え、スクアラミド触媒 **1-32** を開発した(Scheme 1-4)。**1-32** (0.1 mol%)を触媒として用いたペンタン-2,4-ジオン **1-33** のニトロスチレン **1-34** への 1,4-付加反応は、付加体 **1-35** を高いエナンチオ選択性で与える。<sup>28)</sup>

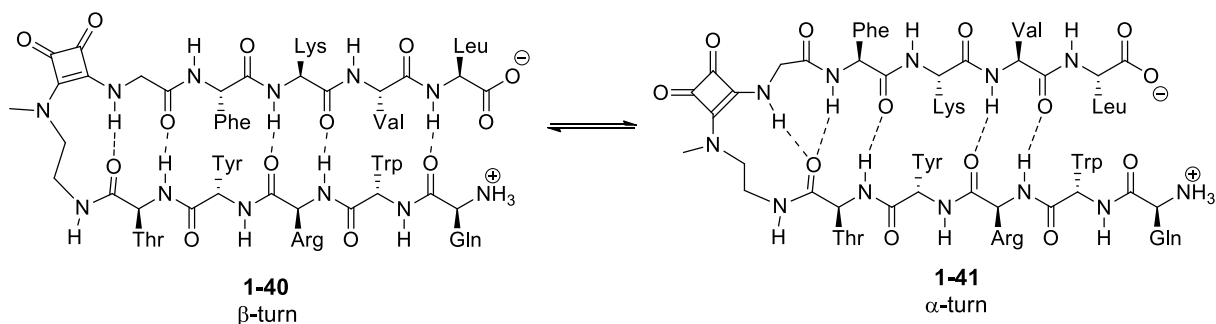
また、Jørgensen らは環状  $\alpha$ -ケトエステル **1-36** の  $\alpha$ -ケトホスホネート **1-37** への 1,4-付加反応が、スクアラミド触媒 **1-32** の存在下、高い選択性で進行し付加体 **1-38** を与えることを報告している。<sup>29)</sup> 本反応はチオウレア触媒 **1-39** を用いた場合には低収率かつ低選択性であったことから、本反応におけるスクアラミド触媒の優位性が示された。



**Scheme 1-4.**

・スクアラミドによるペプチドのフォールディング制御<sup>30)</sup>

最近 Rotger らは、スクアラミドをペプチドのターンコンフォメーションのモジュールとして利用できることを報告している (Figure 1-5)。スクアラミドモジュールを組み込んだハイブリッドペプチドは水中でヘアピン構造をとり、 $\beta$ -ターン **1-40** と制御することが困難とされている  $\alpha$ -ターン **1-41** の平衡状態となることが述べられている。



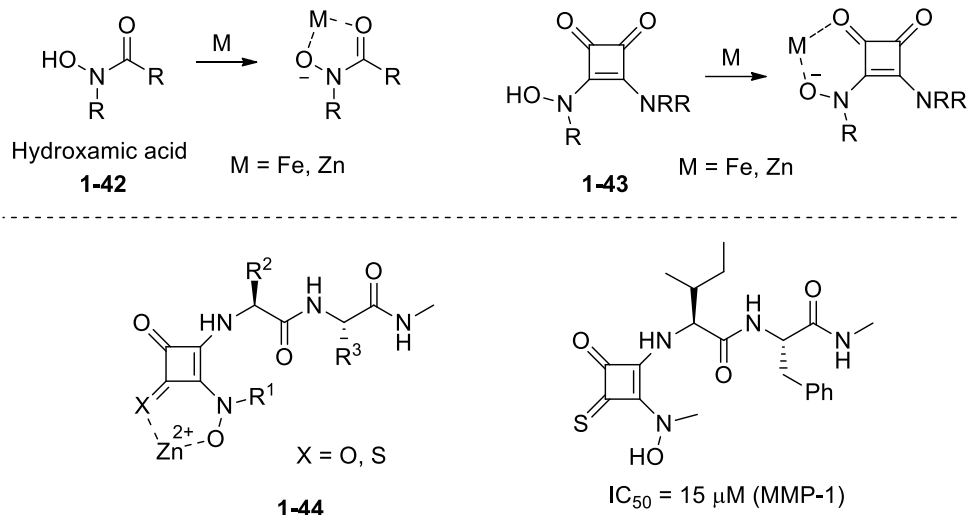
**Figure 1-5.** Squaramide-based reverse-turn module.

金属の配位子として

・ヒドロキサム酸等価体

2003年、Brückner らによって、ヒドロキサム酸 **1-42** の等価体としてスクアラミドを用いた **1-43** が合成された (Figure 1-6)。<sup>31)</sup> スクアラミド **1-43** は **1-42** と同様に鉄(III)イオンとキ

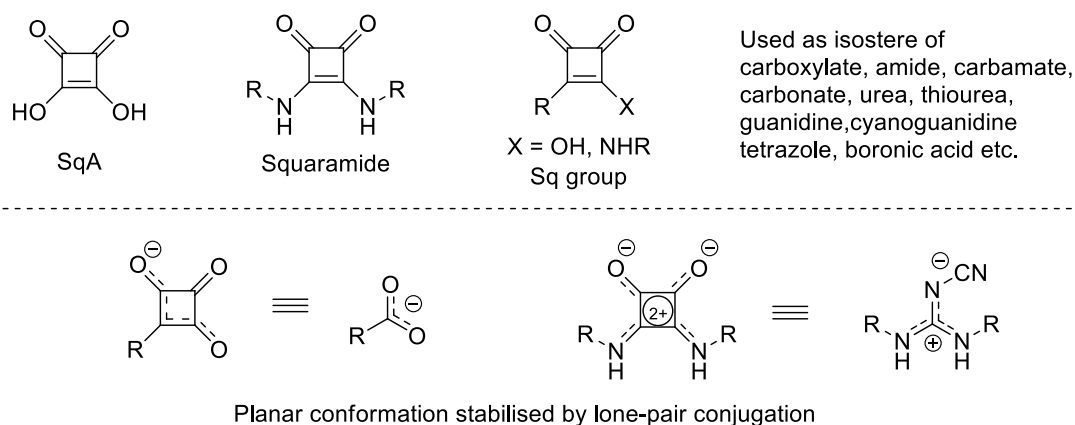
レート錯体を形成することから、化学センサーとしての潜在性が報告されている。また、Setoらは亜鉛とのキレート形成能を利用した、金属プロテアーゼ阻害剤の開発を報告している。<sup>32)</sup> プロテアーゼの認識部位としてペプチド鎖を導入した誘導体 **1-44** を合成し、酵素活性中心に亜鉛イオンをもつ MMP-1 に対して最大 IC<sub>50</sub> 値 15 μM の阻害活性を見出している。



**Figure 1-6.** Hydroxamic squaramide derivatives as metal chelators.

### スクアリン酸、スクアラミドを利用したメディシナルケミストリー

Sq 基やスクアラミドは酸素および窒素上のローンペアが 4 員環平面上に共役していることから、カルボン酸やグアニジンなどの等価体としてみなされる(Figure 1-7)。これまでに SqA 含有生理活性物質が数多く設計されてきた。その中でも特に有益な生理活性が見出されたものを Figure 1-8 に示した。



**Figure 1-7.** Sq group and squaramide as isosteres of carboxylic acid, urea, and guanidine.

(1) ホスホノ酢酸類縁体<sup>33)</sup>

ホスホノ酢酸 **1-45** は七面鳥の疱疹ウイルス由来の RNA と DNA ポリメラーゼに対して、ピロリン酸の結合部に競争的に結合し、ピロリン酸の交換反応を阻害する。Sq 基を導入した類縁体 **1-46** は、ホスホノ酢酸と同程度の活性であると報告されている。

(2) ロザルタン類縁体<sup>34)</sup>

ロザルタン (**1-47**) はアンジオテンシンⅡのアンタゴニストであり、高血圧治療薬の開発に向けた類縁体合成が多数報告されている。中でも、ロザルタンと同様にテトラゾールを含む類縁体 **1-48b** は、ラット腎臓腺細胞を用いた結合実験において、ロザルタンの 5 倍の強さの活性を示す。Sq 基を導入した化合物 **1-48a** は、**1-48b** には劣るもののロザルタンと同程度の活性を示すと報告されている。

(3) シメチジン誘導体<sup>35)</sup>

シメチジン (**1-49**) はヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体のアンタゴニストである。消化性潰瘍性疾患の治療薬開発に向けて類縁体合成が報告されている。シアノグアニジノ基部分にスクアラミドを導入した類縁体 **1-50** は、ヒスタミンを刺激したモルモット心筋を用いたアッセイにおいて強い活性が見出され、大正製薬により臨床試験へと進められたが、2000 年に Phase 1 で中止されている。

(4) ピナシジル類縁体<sup>36)</sup>

ピナシジル (**1-51**) は心循環系のカリウムイオンチャンネル開口薬であり、切迫性尿失禁の治療薬の開発に向けた類縁体合成が報告されている。シアノグアニジノ基部分にスクアラミドを導入した類縁体 **1-52, 1-53** は、ラット膀胱モデルを用いた *in vivo* アッセイにおいて良い経口効能が認められ、ピナシジルの 6~7 倍の強い活性を示した。

(5) CXCR2 アンタゴニスト<sup>37)</sup>

ジアリールウレア **1-54**<sup>38)</sup> は GlaxoSmithKline (GSK) 社により開発された CXCR2 アンタゴニストである。慢性閉塞性肺疾患の治療薬として、様々な製薬会社でこのウレア部位を変更した類縁体の合成がなされた。中でも、スクアラミド **1-55** はウレア **1-54** の 100 倍の活性が認められた。現在、Merck 社において臨床試験 Phase 2 開発中である。



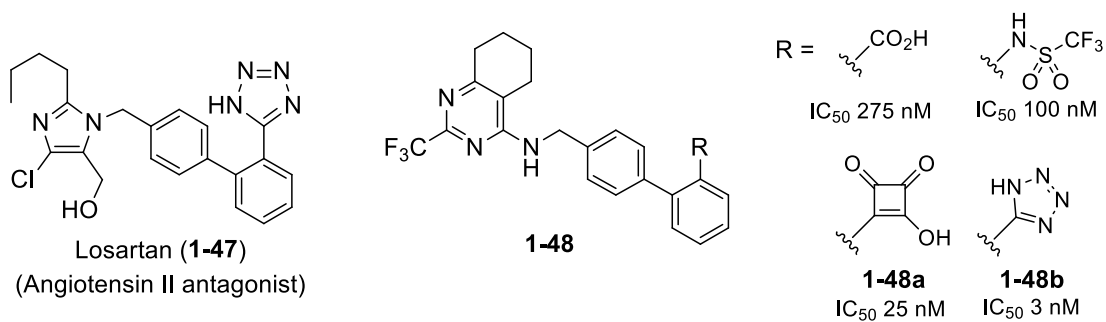
(1)



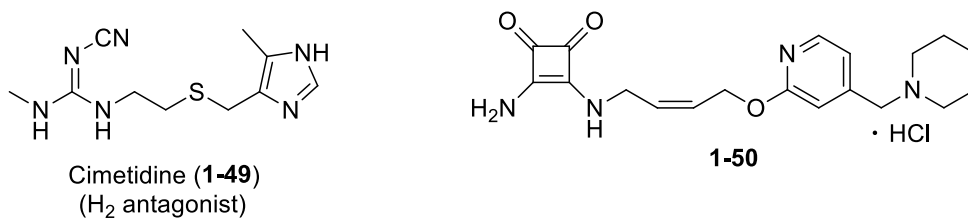
Phosphonoacetic acid **1-45**  
(Viral RNA/DNA polymerase inhibitor)

**1-46**

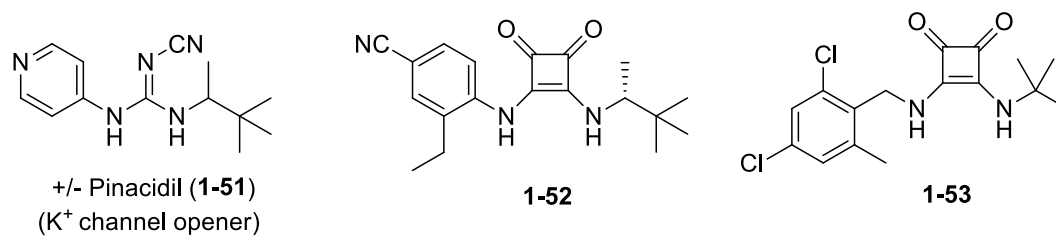
(2)



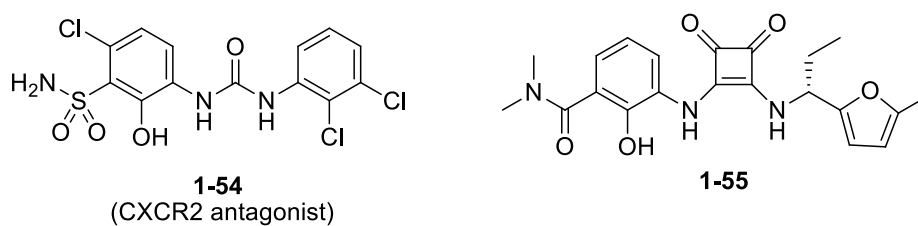
(3)



(4)



(5)



**Figure 1-8.** Sq groups and squaramides used in medicinal chemistry.

## アミノ酸等価体としての利用

Sq 基のカルボン酸等価体としての利用は、アミノ酸の主鎖骨格のカルボン酸や側鎖のカルボン酸を Sq 基に置換した様々なアナログの合成に尽力されてきた。

筆者の所属する研究室では、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸 (Glu) のカルボキシル基を Sq 基に置換した Glu アナログ、 $\beta$ -SqAsp **1-56** および  $\gamma$ -SqGlu **1-57** の合成を行った (Figure 1-9)。<sup>39)</sup> **1-56**, **1-57** に対するラット脳の神経膜を用いた結合活性実験を行った結果、**1-56** は弱いながらもイオンチャンネル型受容体の 3 種のサブタイプ (NMDA 型, KA 型, AMPA 型) のうちの AMPA 型受容体に選択的に結合活性を示した。一方で、**1-57** は Glu よりも多少活性は低下するものの、選択的に AMPA/KA レセプターに結合し、アゴニスト活性を示すことが明らかになった。

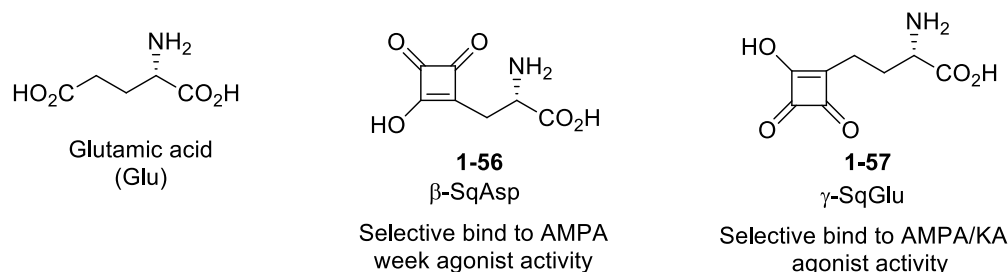
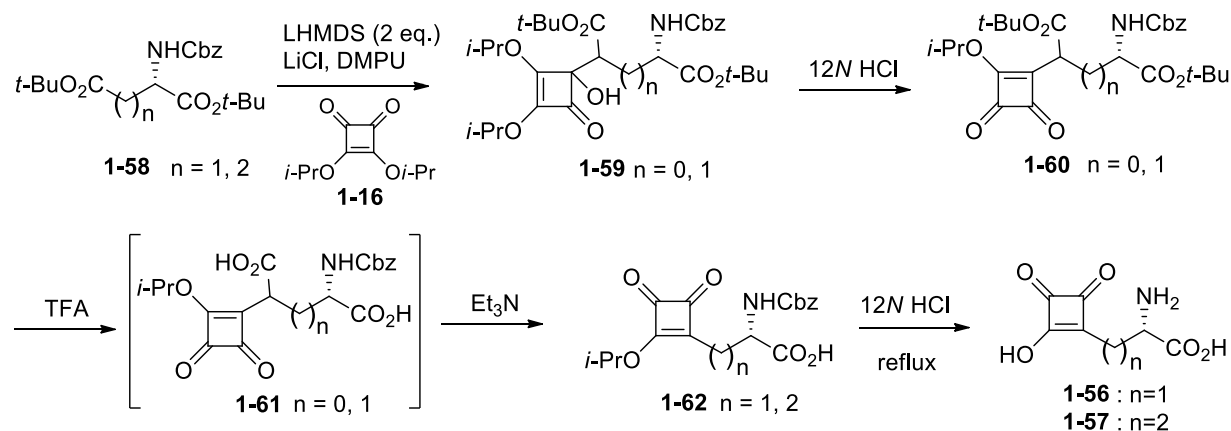


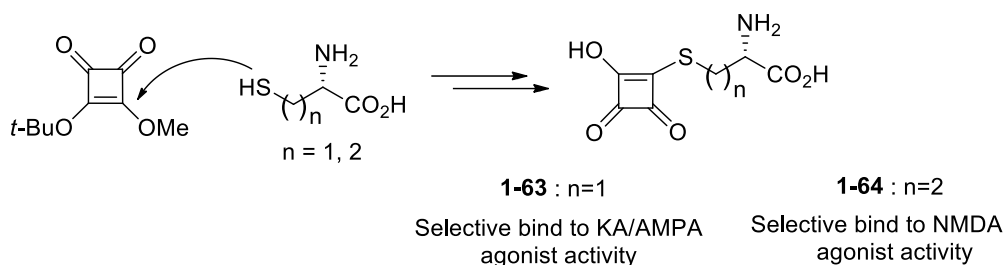
Figure 1-9. Sq group-containing Glu analogs.

**1-56**, **1-57** の合成は、所属研究室により開発されたエステルエノラートの付加反応を利用して行われた (Scheme 1-5)。まず Gu 保護体 **1-58** に対して 2 当量の LHMDS を加えてジアニオンエノラートを発生させ、SqA ジエステル **1-16** に付加させることで **1-59** とする。その後の処理は、Scheme 1-2 に示したスクアリル酢酸の合成と同様の手法により行われた。**1-59** を塩酸処理によって Sq-エステル **1-60** へと変換し、TFA 処理により *tert*-ブチル基を除去し、生じたカルボン酸 **1-61** を Et<sub>3</sub>N で処理することにより脱炭酸反応を進行させ **1-62** とし、最後に脱保護を行うことで **1-56**, **1-57** の合成に成功している。



Scheme 1-5.

また、所属研究室は硫黄原子を介して Sq 基を導入した Glu アナログ **1-63**, **1-64** の合成を報告している(Scheme 1-6)。<sup>40)</sup> SqA ジエステルがチオールと高い反応性を示すことを利用して、システインおよびホモシステインの求核付加-脱離反応により合成がなされた。これらの Glu 受容体に対する結合活性の強さは Glu よりやや劣るものの **1-63** は AMPA/KA 型受容体に対して、**1-64** は NMDA 型に対して選択的に結合することが明らかになった。

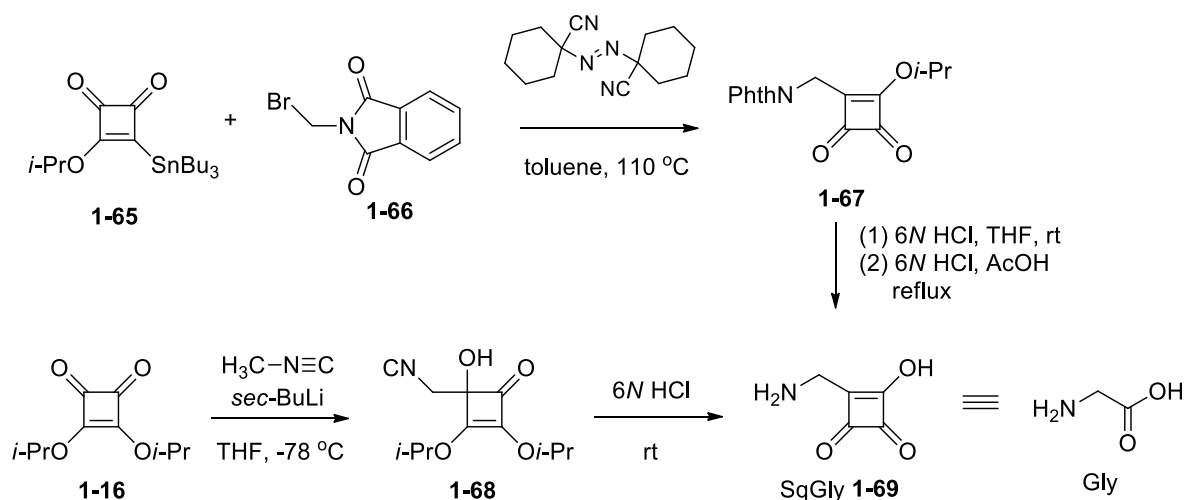


**Scheme 1-6.**

## 1-2. $\alpha$ -アミノスクアリン酸 ( $\alpha$ -Asq) の研究経過

### Libeskind らの SqGly の合成<sup>41)</sup>

$\alpha$ -Asq の最初の報告は、1995 年の Libeskind らによるグリシン(Gly) 型の SqGly **1-69** の合成である。Libeskind らは、ラジカル反応及びイソニトリル由来のカルボアニオンの付加を鍵とする 2 つの経路で SqGly **1-69** に導いている(Scheme 1-7)。スズ化合物 **1-65** とブロモ体 **1-66** をラジカル開始剤の存在下加熱することで、Sq 基にアミノメチル基を導入して **1-67** とし、続く酸処理によってフタロイル(Phth)基を除去することで、**1-69** へと導いている。また、メチルイソシアニドを SqA ジエステル **1-16** に 1,2-付加させた **1-68** に対する酸処理によっても SqGly **1-69** の合成がなされている。

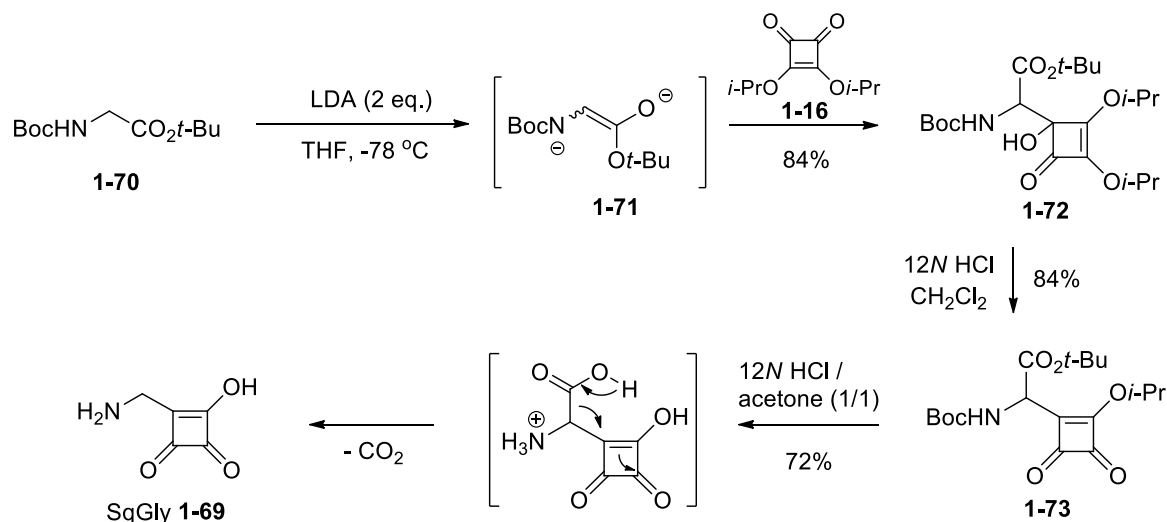


**Scheme 1-7.**

Libeskind らによる手法は短段階で合成できるものの、 $\alpha$  位に置換基の存在しない SqGly の報告のみである。種々の  $\alpha$ -アミノ酸アナログの合成に向けては、 $\alpha$  位に置換基を導入可能な  $\alpha$ -Asq の合成法の開発が望まれた。以降記載する  $\alpha$ -Asq に関する研究は、筆者の所属する研究室で行われたものである。

### ジアニオンエノラートの付加反応による SqGly の合成<sup>39)</sup>

大船らは Boc-Gly-O*t*-Bu **1-70** の付加反応を経る経路で SqGly **1-69** の合成を達成した (Scheme 1-8)。**1-70** を LDA で処理することで得られるジアニオンエノレート **1-71** を生じさせ、SqA ジエステル **1-16** へと付加させることで、高い収率でヒドロキシシクロブテノン **1-72** を与えた。**1-72** を塩酸処理により Sq-エステル **1-73** に変換後、アセトン中、濃塩酸で処理することで、Boc 基、*t*-Bu 基、*i*-Pr 基の脱保護と共に、脱炭酸反応が室温下で容易に進行し、SqGly **1-69** を与えた。



Scheme 1-8.

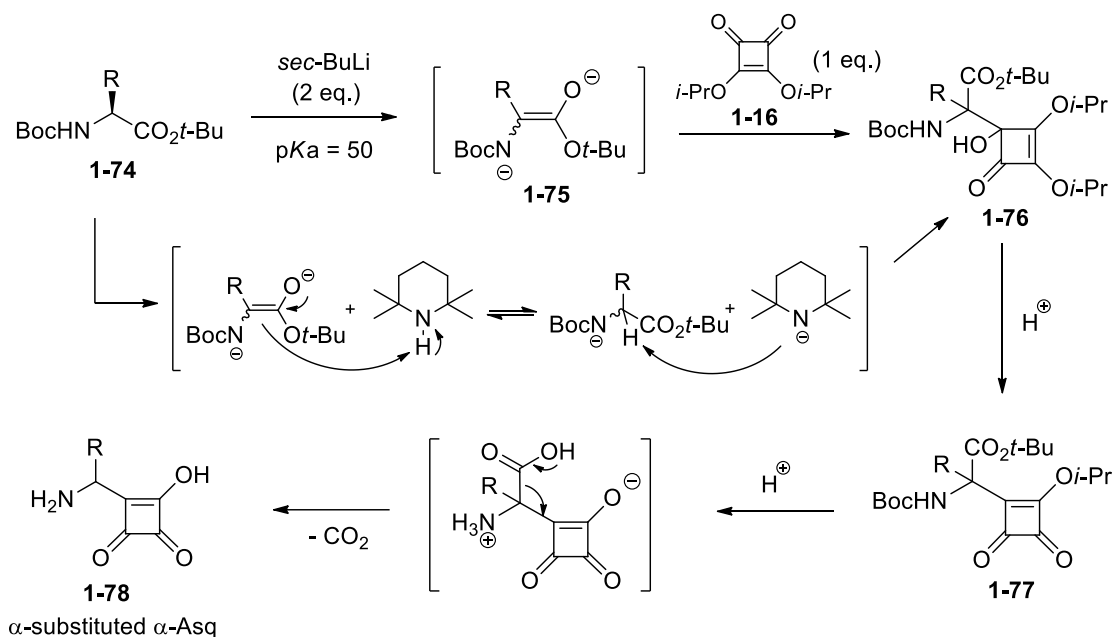
### $\alpha$ 位に置換基を導入した $\alpha$ -Asq 類の合成<sup>17)</sup>

Scheme 1-8 に記した SqGly の合成法は、 $\alpha$  位に置換を導入した  $\alpha$ -Asq 類の合成への土台となった。天然型アミノ酸である Gly を出発原料として用いていることから、その他のアミノ酸を用いれば同様にアミノ酸アナログを合成できると考えられた。また、SqGly **1-69** の前駆体 **1-73** は古くからアミノ酸合成の中間体として利用されるアミノマロン酸の等価体として見なすことができる。2005年に、ジアニオンエノラートを用いた手法 (Route 1) および、アミノマロン酸等価体に対するアルキル化を用いた手法 (Route 2) の 2 つの経路で  $\alpha$ -置換- $\alpha$ -Asq 類の合成を報告した。以下その詳細を述べる。

#### ・ジアニオンエノラートを用いる $\alpha$ -Asq の合成 (Route 1)<sup>17a)</sup>

Route 1 は、SqGly の付加反応と同様に Boc-アミノ酸 **1-74** から発生させたジアニオンエノレート **1-75** を用いる手法である (Scheme 1-9)。この際、LDA や LTMP などのリチウムア

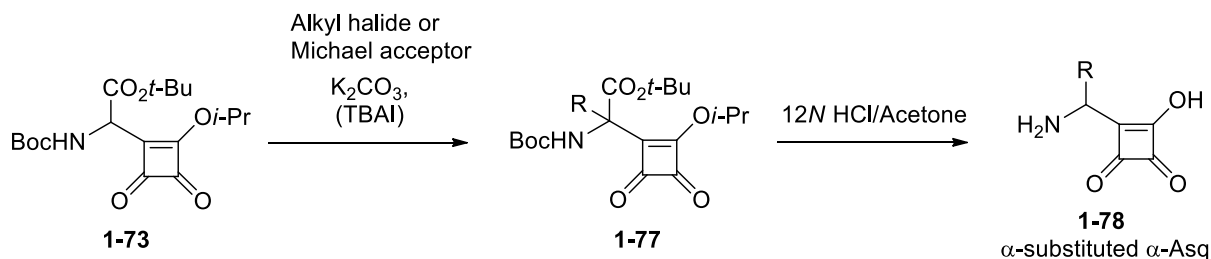
ミド系の塩基を用いた場合には付加体 **1-76** は低収率であった。ジアニオンエノラートの重水素化実験を通して導いた作業仮説により、ジアニオンエノラート **1-75** がアミンから再びプロトンを引き抜く逆反応との平衡が生じていると考えられた。そのため、この平衡を完全に除外する反応条件として、*sec*-BuLi を用いることでこの問題を回避し、高収率で付加体 **1-76** を得ることに成功した。ヒドロキシシクロブテノン **1-76** からは SqGly の合成と同様に、酸処理による Sq-エステル **1-77** への変換とその後の塩酸処理による脱保護、脱炭酸反応によって、 $\alpha$  位に置換基を導入した  $\alpha$ -Asq **1-78** の合成に成功した。



**Scheme 1-9.**

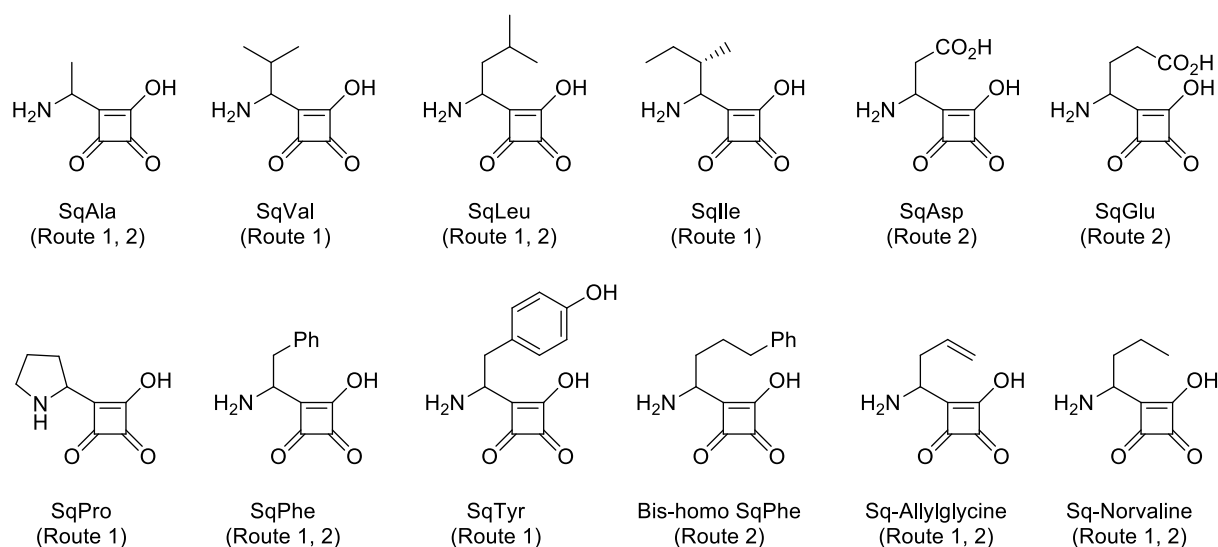
・アミノマロン酸等価体を用いた  $\alpha$ -Asq の合成 (Route 2)<sup>17b)</sup>

Route 2 は、SqGly **1-69** の合成過程で得られるアミノマロン酸等価体 **1-73** に対するアルキル化を用いる手法である(Scheme 1-10)。塩基に炭酸カリウムを用いて **1-73** の  $\alpha$  位の水素を引き抜き、続く求電子剤としてアルキルハライドもしくはマイケルアクセプターを作用させることによりアルキル化体 **1-77** を得た。得られた **1-77** の酸処理によって  $\alpha$  位に置換基を導入した  $\alpha$ -Asq **1-78** が合成された。



**Scheme 1-10.**

著者の所属する研究室では、Route 1 と Route 2 の二つの手法を用いて天然型、及び非天然型の側鎖を持つ合計 12 種類の  $\alpha$ -置換- $\alpha$ -Asq 類の合成に成功している (Figure 1-10)。

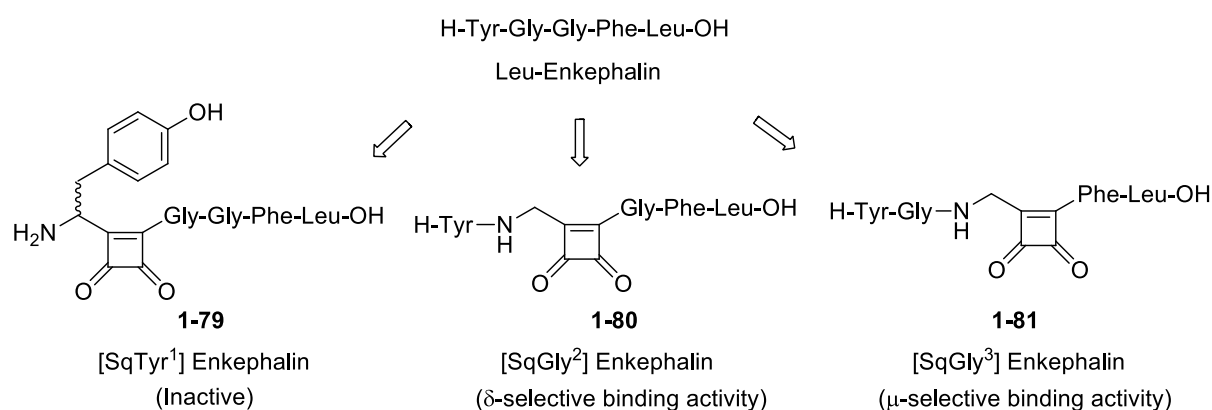


**Figure 1-10.** Successful synthetic examples of  $\alpha$ -substituted  $\alpha$ -Asq.

### $\alpha$ -Asq のペプチド化

・ロイシンエンケファリンアナログの合成<sup>17c)</sup>

$\alpha$ -Asq のペプチド化に向けて、ロイシンエンケファリンアナログの合成がなされた。エンケファリンは内因性オピオイドペプチドとして鎮痛作用や睡眠などの生体機能に密接に関わっている。エンケファリンの構造-活性相関研究の一環として、Figure 1-11 に示す 3 つのアナログ **1-79** ~ **1-81** が合成された。CHO 細胞に発現した  $\kappa$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  のオピオイド受容体を用いた結合実験を行った結果、エンケファリンよりも結合活性はかなり劣るものの、**1-80** は  $\delta$  受容体に、**1-81** は  $\mu$ ,  $\delta$  受容体に選択的に結合活性を示した。以下、合成の詳細を説明する。

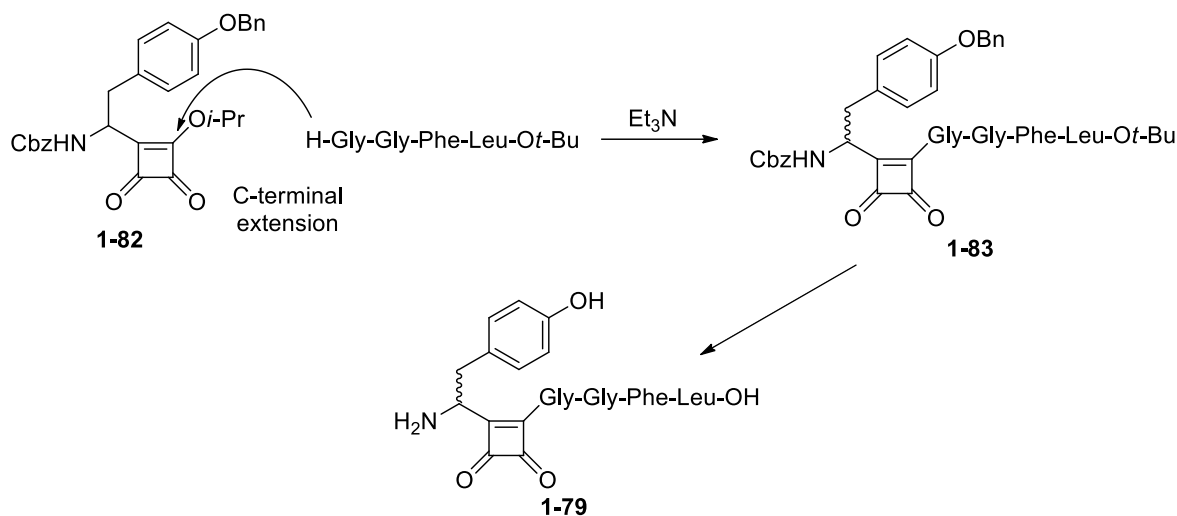


**Figure 1-11.** Incorporation of  $\alpha$ -Asq into Leu-enkephalin.

### **1-79** の合成 : ペプチドの N 末端への $\alpha$ -Asq の導入

エンケファリンの N 末端の Tyr を SqTyr に置換したエンケファリンアナログ **1-79** の合成

は、SqTyr の保護体 **1-82** の Sq-エステル部に、Et<sub>3</sub>N の存在下、ペプチド鎖を導入することで、SqTyr の C 末端側の伸長を行うことができた。得られた **1-83** に対して、30% HBr/AcOH で処理することにより、保護基の脱保護を行い **1-79** へと導かれた (Scheme 1-11)。

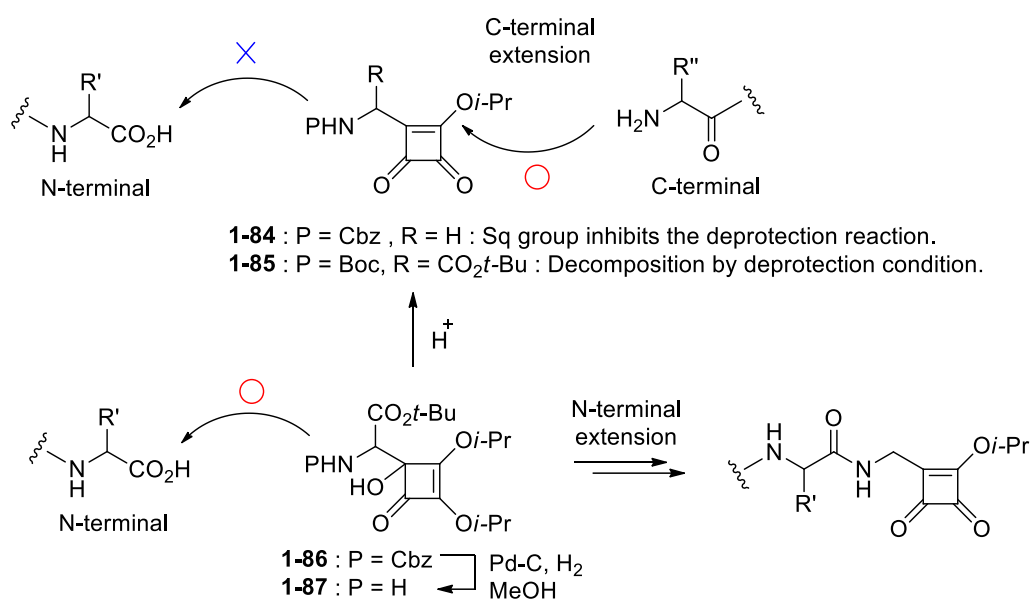


**Scheme 1-11.**

#### 1-80, 1-81 の合成：ペプチド内部への SqGly の導入

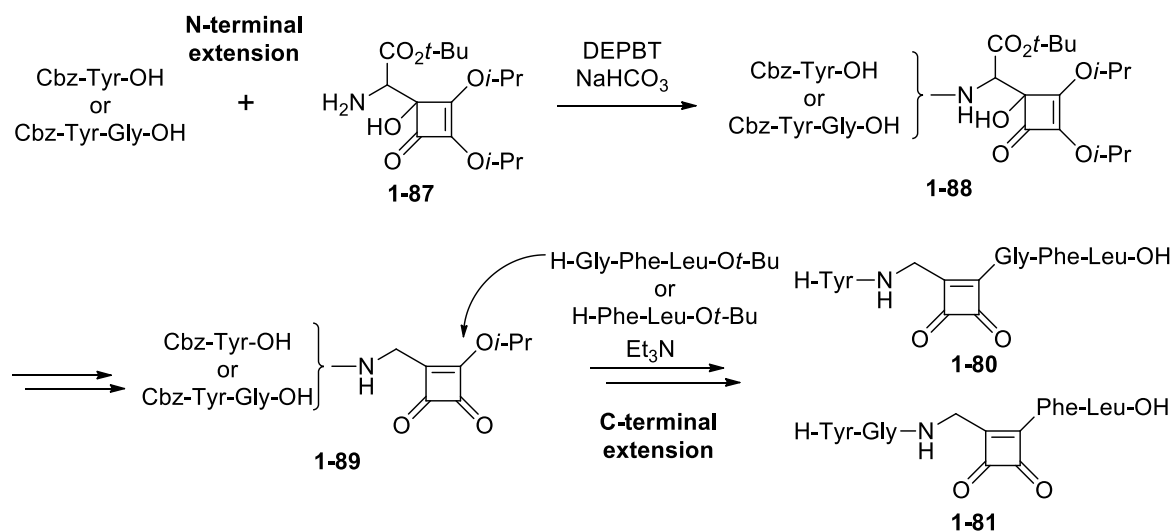
N 末端への  $\alpha$ -Asq の導入とは異なり、ペプチドの内部に SqGly を導入する場合、SqGly の N 末端、および C 末端でのペプチド鎖の伸長が必要となる。SqGly の両末端のペプチド化には、当初、保護基を導入した Cbz 体 **1-84** もしくは Boc 体 **1-85** が想定された (Figure 1-12)。しかしながら、**1-84** および **1-85** に対する C 末端側のペプチド鎖の導入は、Sq-エステル部へのペプチド鎖の付加-脱離反応によって行えるものの、N 末端のペプチド鎖の伸長は行うことができなかった。アミノ基を Cbz で保護した **1-84** は、Sq 基の存在により接触水素化による脱 Cbz 化が阻害される。<sup>24)</sup> また Boc で保護した **1-85** からのフリーアミンの生成は、酸処理による脱保護条件によって基質が分解する。

そのため、SqGly に対する N 末端へのペプチド鎖の伸長は **1-84** の前駆体であるヒドロキシシクロブテノン **1-86** を用いる計画がなされた。**1-86** の接触水素化による Cbz 基の脱保護は縮合に必要なフリーアミンを有する **1-87** を与える。**1-87** のフリーアミンへのペプチド鎖の導入によって、SqGly の N 末端伸長を行う合成経路がとられた。



**Figure 1-12.** Method of incorporation of SqGly into peptide.

上記の合成法によって、エンケファリンアナログ **1-80** および **1-81** の合成がなされた (Scheme 1-12)。ヒドロキシシクロブテノン **1-87** と N 末端のペプチド鎖を縮合し **1-88** とした後、酸処理による Sq-エステルへの変換と *tert*-ブトキシカルボニル基の除去により **1-89** とする。**1-89** の Sq-エステル部に C 末端側のペプチド鎖を導入することで、**1-80** および **1-81** へと導かれた。

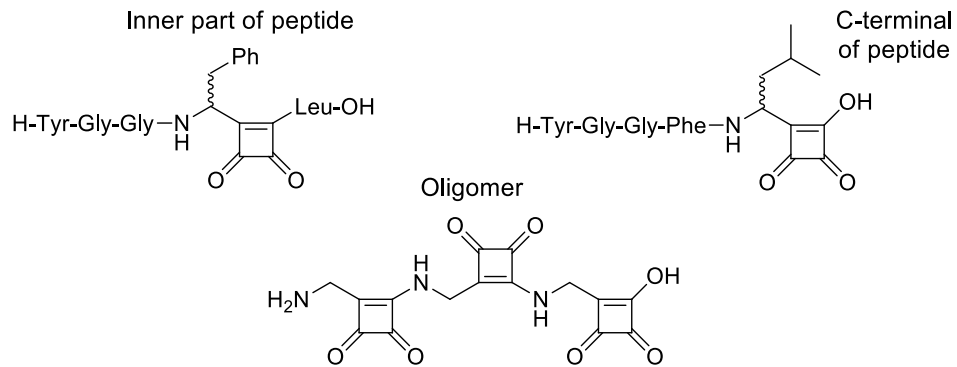


**Scheme 1-12.**

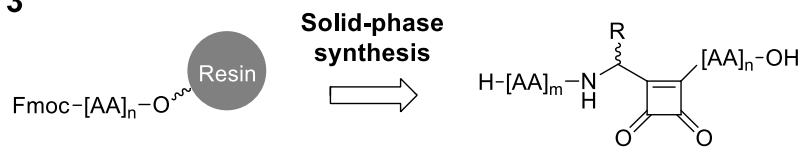


以上述べたように、所属研究室では SqGly と  $\alpha$  位に置換基を導入した  $\alpha$ -Asq を併せて 13 種類を合成し、ペプチド化に成功している。しかし、 $\alpha$ -Asq を導入した生理活性ペプチドの合成の幅を広げるためには、 $\alpha$ -Asq のペプチド化について更なる調査が必要であると考えられる。本論文では、 $\alpha$ -Asq の機能を利用した生理活性ペプチドの開発を目的とし、ペプチド内のあらゆる場所に、置換基をもつ  $\alpha$ -Asq を導入できる手法を確立する。まず第二章では、 $\alpha$  位に置換をもつ  $\alpha$ -Asq をペプチド内部および C 末端に導入したペプチドの初の合成について述べる。また、構造が興味深い  $\alpha$ -Asq のオリゴマーの合成を併せて述べる。第三章では、一般的なペプチド合成に用いられる固相合成法を用いた  $\alpha$ -Asq のペプチド化について述べる。 $\alpha$ -Asq の固相合成への適用はペプチドライブラリーの構築や長鎖ペプチドアナログの合成を可能とした。構築したライブラリーの生物活性評価、並びに消化酵素に対する抵抗性評価について併せて述べる。第四章では、Sq 基の電子不足な性質に着目したシステインプロテアーゼ阻害剤の開発について述べる。Caspase-3 を標的とし、10 種類の  $\alpha$ -Asq 含有ペプチドを合成し、その阻害活性、選択性について調査した。最後に第五章では、新規な SqA 誘導体として、 $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸の光学活性体としての合成並びにペプチド化、酵素阻害剤への適用について述べる。

## Chapter 2 Synthesis of $\alpha$ -Asq-containing peptides

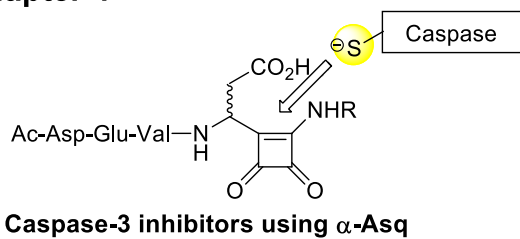


## Chapter 3



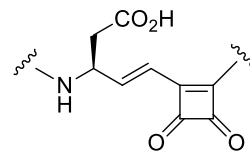
- Synthesis of peptide library and long-chain peptide
- Biological assay
- Proteolytic degradation study

## Chapter 4



Caspase-3 inhibitors using  $\alpha$ -Asq

## Chapter 5



$\alpha,\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -amino squaric acid

- Incorporation into peptide
- Application to caspase-3 inhibitor

## References for Chapter 1

- 1) (a) Paik, S.; White, E. H. *Tetrahedron* **1996**, *52*, 5303. (b) Moree, W. J.; van der Marel, G. A.; Liskamp, R. J. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5157. (c) Yang, K-W.; Golich, F. C.; Sigdel, T. K.; Crowder, M. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 5150.
- 2) (a) Lacoste, A. M.; Chollet-Gravey, A. M.; Quang, L. V.; le Goffic, F. *Eur. J. Med. Chem.* **1991**, *26*, 255. (b) Yang, K-W; Brand, J. J.; Chatwood, L. L.; Crowder, M. W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 1085.
- 3) (a) Demko, Z. P.; Sharpless, K. B. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 2525. (b) Herr, R. J. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, *10*, 3379. (c) Patani, G. A.; LaVoie, E. J. *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 3147.
- 4) (a) Rodriguez, M.; Aumelas, A.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 5153. (b) Rodriguez, M.; Heitz, A.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 7319. (c) Linares, M.; Devin, C.; Azay, J.; Berge, G.; Fehrentz, J. A.; Martinez, J. *Eur. J. Med. Chem.* **1997**, *32*, 767. (d) Kende, A. S.; Dong, H-Q.; Mazur, A. W.; Ebetino, F. H. *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 6015.
- 5) (a) Goschke, R.; Stutz, S.; Rasetti, V.; Cohen, N-C.; Rahuel, J.; Rigollier, P.; Baum, H-P.; Forgiarini, P.; Schnell, C. R.; Wagner, T.; Gruetter, M. G.; Fuhrer, W.; Schilling, W.; Cumin, F.; Wood, J. M.; Maibaum, J. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4818. (b) Maibaum, J.; Stutz, S; Goschke, R.; Rigollier, P.; Yamaguchi, Y.; Cumin, F.; Rahuel, J.; Baum, H-P.; Cohen, N-C.; Schnell, C. R.; Fuhrer, W.; Gruetter, M. G.; Schilling, W.; Wood, J. M. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 4832. (c) Gosh, A. K.; Xi, K.; Ratia, K.; Santarsiero, B. D.; Fu, W.; Harcourt, B. H.; Rota, P. A.; Baker, S. C.; Johnson, M. E.; Mesecar, A. D. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6767. (d) Ma, D.; Xie, W.; Zou, B.; Lei, Q.; Pei, D. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 8103. (e) Li, Z-H.; Bulychev, A.; Kotra, L. P.; Massova, I.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 13003.
- 6) (a) Jakobsche, C. E.; Peris, G.; Miller, S. J. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 6707. (b) Wiktelius, D.; Luthman, K. *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 603. (c) Xiao, J.; Weisblum, B.; Wipf, P. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 4731. (d) Wipf, P.; Xiao, J.; Jiang, J.; Belikova, N. A.; Tyurin, V. A.; Fink, M. P.; Kagan, V. E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *125*, 12460. (e) Oishi, S.; Kamano, T.; Niida, A.; Odagaki, Y.; Hamanaka, N.; Yamamoto, M.; Ajito, K.; Tamamura, H.; Otaka, A.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 6162. (f) Ibuka, T.; Habashita, H.; Otaka, A.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 4370.
- 7) (a) Narumi, T.; Tomita, K.; Inokuchi, E.; Kobayashi, K.; Oishi, S.; Ohno, H.; Fujii, N. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4332. (b) Dutheil, G.; Couve-Bonnaire, S.; Pannecoucke, X. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1290. (c) Narumi, T.; Niida, A.; Tomita, K.; Oishi, S.; Otaka, A.; Ohno, H.; Fujii, N. *Chem. Commun.* **2006**, 4720. (d) Otaka, A.; Watanabe, J.; Yukimasa, A.; Sasaki, Y.; Watanabe, H.; Kinoshita, T.; Oishi, S.; Tamamura, H.; Fujii, N. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 1634.
- 8) (a) Molteni, M.; Bellucci, M. C.; Bigotti, S.; Mazzini, S.; Volonterio, A.; Zanda, M. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 2286. (b) Bigotti, S.; Meille, S. V.; Volonterio, A.; Zanda, M. *J. Fluorine Chem.* **2008**, *129*, 767. (c) Turconi, J.; Lebeau, L.; Paris, J-M.; Mioskowski, C. *Tetrahedron Lett.* **2006**,

- 47, 121. (d) Molteni, M.; Pesenti, C.; Sani, M.; Volonterio, A.; Zanda, M. *J. Fluorine Chem.* **2004**, *125*, 1735. (e) Molteni, M.; Volonterio, A.; Zanda, M. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 3387.
- 9) (a) Freeman, N. S.; Hurevich, M.; Gilon, C. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1737. (b) Kato, D.; Verhelst, S. H. L.; Sexton, K. B.; Bogoyo, M. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 5649. (c) Asgian, J. L.; James, K. E.; Li, Z. Z.; Carter, W.; Barrett, A. J.; Mikolajczyk, J.; Salvesen, G. S.; Powers, J. C. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4958.
- 10) (a) Ten Brink, R. *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 418. (b) Anthony, N. J.; Gomez, R. P.; Holtz, W. J.; Murphy, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 3821. (c) Norman, B. H.; Krohn, J. S. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4151.
- 11) (a) Spatola, A. F.; Bettag, A. L. *J. Org. Chem.* **1981**, *46*, 2393. (b) Kaltenbronn, J. S.; Hudspeth, J. P.; Lunney, E. A.; Michniewicz, B. M.; Nicolaides, E. D.; Repine, J. T.; Roark, W. H.; Stier, M. A.; Tinney, F. J.; Woo, P. K. W.; Essenburg, A. D. *J. Med. Chem.* **1990**, *33*, 838.
- 12) (a) Tedeschi, T.; Sforza, S.; Corradini, R.; Marchelli, R. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8395. (b) deSolms, S. J.; Giuliani, E. A.; Graham, S. L.; Koblan, K. S.; Kohl, N. E.; Mosser, S. D.; Oliff, A. T.; Pompliano, D. L.; Rands, E.; Scholtz, T. H.; Wiscount, C. M.; Gibbs, J. B.; Smith, R. L. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2651. (c) Cody, W. L.; He, J. X.; Reilly, M. D.; Haleen, S. J.; Walker, D. M.; Reyner, E. L.; Stewart, B. H.; Doherty, A. M. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2228. (d) Waelchli, R.; Gamse, R.; Bauer, W.; Meigel, H.; Lier, E.; Freyen, J. H. M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1151.
- 13) (a) Cohen, S.; Lacher, J. R.; Park, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3480. (b) Park, J. D.; Cohen, S.; Lacher, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2919. (c) Seitz, G.; Imming, P. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1227. (d) Schmidt, A. H. *Synthesis* **1980**, 961. (e) Serratosa, F. *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 170.
- 14) (a) West, R.; Niu, H.-Y.; Powell, D. L.; Evans, N. V. *J. Am. Chem. Soc.* **1960**, *82*, 6204. (b) West, R.; Ito, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2580. (c) West, R.; Eggerding, D.; Perkins, J.; Handy, D.; Tuazon, E. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1710. (d) Aihara, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 1633. (e) Schleyer, P. R.; Najafian, K.; Kiran, B.; Kiran, B.; Jiao, H. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 426.
- 15) (a) Quinonero, D.; Fronta, A.; Ballester, P.; Deya, P. M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 2001. (b) Quinonero, D.; Garau, C.; Frontera, A.; Ballester, P.; Costa, A.; Deya, P. M. *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 433.
- 16) For reviews: (a) Wurm, F. M.; Klok H.-A. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 8220. (b) Ballatore, C.; Huryn, D. M.; Smith, A. B. III. *ChemMedChem.* **2013**, *8*, 385. (c) Marson, C. M. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 5514. (d) Storer, R. I.; Aciro, C.; Jones, L. H. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 2330. (e) Shinada, T.; Ishida, T.; Ohfuné, Y. *J. Synth. Org. Chem., Jpn.* **2007**, *65*, 32. (f) Ohno, M.; Eguchi, S. In *Bioactive Heterocycles I: Topics in Heterocyclic Chemistry*; S. Eguchi, ed.; Vol. 6; Springer: Berlin, **2006**; pp 1. (g) Seitz, G.; Imming, P. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 1227. (h) Serratosa, F. *Acc. Chem. Res.* **1983**, *16*, 170. (i) Schmidt, A. H. *Synthesis* **1980**, 961. (j) West, R. In *Oxocarbons*; Academic: New York, **1980**. (k) West, R.; Niu, J. In *Nonbenzenoid Aromatics*; J. P. Snyder, Ed.;

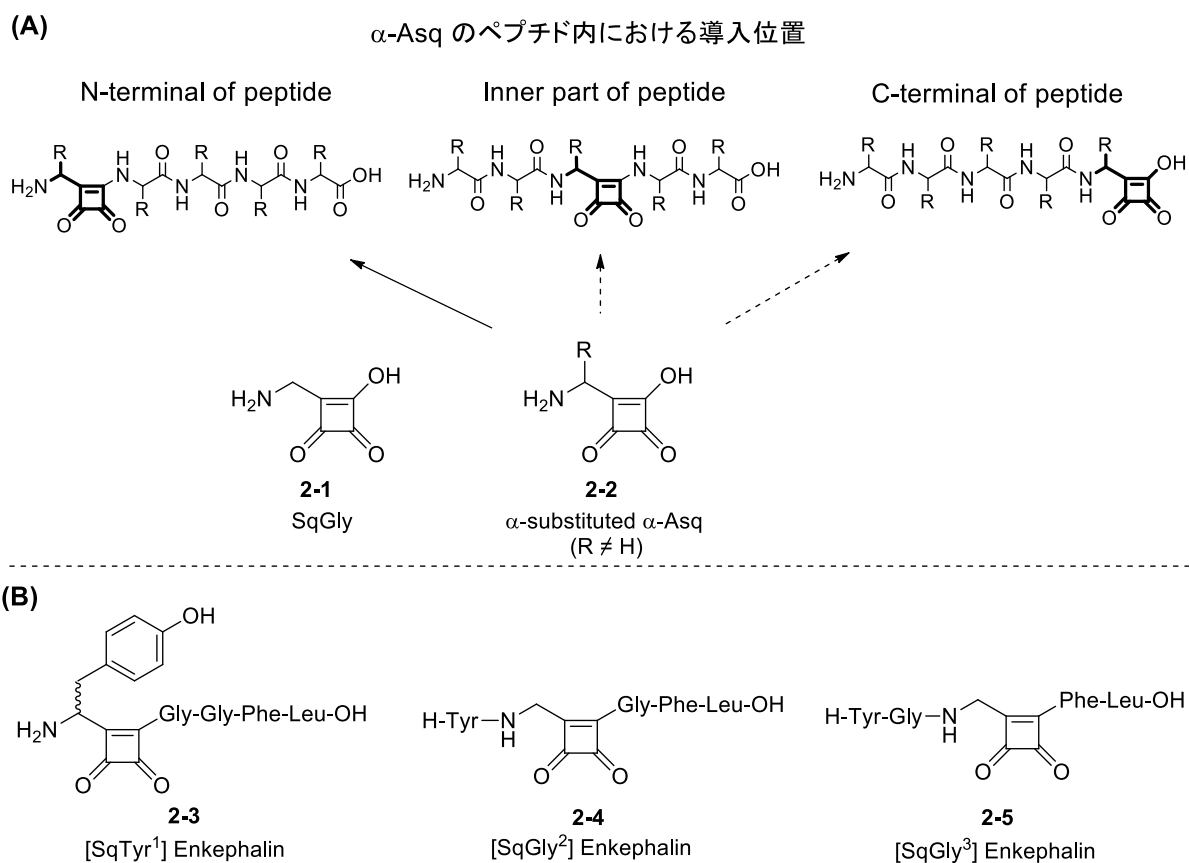
Academic: New York, **1969**; p 311.

- 17) (a) Shinada, T.; Ishida, T.; Hayashi, K.; Yoshida, Y.; Shigeri, Y.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7614. (b) Ishida, T.; Shinada, T.; Ohfuné, Y. *Synthesis* **2005**, 2723. (c) Ishida, T.; Shinada, T.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 311.
- 18) For a review: Mukkanti, A.; Periasamy, M. *ARKIVOC* **2005**, (xi), 48.
- 19) (a) Reed, M. W.; Pollart, D. J.; Perri, S. T.; Foland, L. D.; Moore, H. W. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2477. (b) Liebeskind, L. S.; Fengl, R. W.; Wirtz, K. R.; Shawe, T. T. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2482.
- 20) (a) Liebeskind, L. S.; Fengl, R. W. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 5359. (b) Liebeskind, L. S.; Zhang, J. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6379. (c) Liebeskind, L. S.; Yu, M. S.; Fengl, R. W. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 3543. (d) Liebeskind, L. S.; Yu, M. S.; Yu, R. H.; Wang, J.; Hagen, K. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 9048. (e) Shi, X.; Amin, Sk. R.; Liebeskind, L. S. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 1650.
- 21) (a) Liebeskind, L. S.; Wang, J. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31*, 4293. (b) Rubin, Y.; Sophia, S. L.; Knobler, C. B.; Anthony, J.; Boldi, A. M.; Diederich, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 6943. (c) Rubin, Y.; Knobler, C. B.; Diederich, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 1607. (d) Sidduri, A.; Budries, N.; Laine, R. M.; Knochel, P. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 7515.
- 22) (a) Hergueta, A. R.; Moore, H. W. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 5979. (b) Zhang, S.; Liebeskind, L. S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4042. (c) Paquette, L. A. *Eur. J. Org. Chem.* **1998**, 1709. (d) Ohno, M.; Noda, M.; Yamamoto, Y.; Eguchi, S. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 707. (e) Yamamoto, Y.; Ohno, M.; Eguchi, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9653. (f) Ohno, M.; Yamamoto, Y.; Eguchi, S. *J. Synth. Org. Chem., Jpn.* **1997**, *55*, 785. (g) Lyer, S.; Liebeskind, S. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 2759.
- 23) Hayashi, K.; Shinada, T.; Sakaguchi, K.; Horikawa, M.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7091.
- 24) Shinada, T.; Hayashi, K.; Yoshida, Y.; Ohfuné, Y. *Synlett* **2000**, 1506.
- 25) (a) Quinonero, D.; Prohens, R.; Garau, C.; Frontera, A.; Ballester, P.; Costa, A.; Deya, P. M. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *351*, 115. (b) Prohens, R.; Tomas, S.; Morey, J.; Deya, P. M.; Ballester, P.; Costa, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1063.
- 26) Davis, A. P.; Draper, S. M.; Dunne, G.; Ashton, P. *Chem. Commun.* **1999**, 2265.
- 27) (a) Yang, W.; Du, D.-M. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 5450. (b) Okino, T.; Hoashi, Y.; Takemoto, Y. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12672.
- 28) (a) Malerich, J. P.; Hagihara, K.; Rawal, V. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14416. (b) Zhu, Y.; Malerich, J. P.; Rawal, V. H. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 153.
- 29) Jiang, H.; Paixao, M. W.; Monge, D.; Jorgensen, K. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2775.
- 30) Martínez, L.; Martorell, G.; Sampedro, A.; Ballester, P.; Costa, A.; Rotger, C. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2980.
- 31) Lim, N. C.; Morton, M. D.; Jenkins, H. A.; Bruckner, C. *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 9233.
- 32) Onaran, M. B.; Comeau, A. B.; Seto, C. T. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 10792.

- 33) Kim, C. U.; Misco, P. F. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3961.
- 34) Soll, R. M.; Kenney, W. A.; Primeau, J.; Garrick, L.; McCaully, R. J.; Colatsky, T.; Oshiro, G.; Park, C. H.; Hartupee, D.; White, V.; McCallum, J.; Russo, A.; Dinish, J.; Wojdan, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1993**, *3*, 757.
- 35) Kojima, K.; Nakajima, K.; Kurata, H.; Tabata, K. Utsui, Y. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 1795. (b) Kijima, H.; Isobe, Y.; Muramatsu, M.; Yokomori, S.; Suzuki, M.; Higuchi, S. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 151.
- 36) (a) Butera, J. A.; Antane, M. M.; Antane, S. A.; Argentieri, T. M.; Freedon, C.; Graceffa, R. F.; Hirth, B. H.; Jenkins, D.; Lennox, J. R.; Matelan, E.; Norton, N. W.; Quagliato, D.; Sheldon, J. H.; Spinelli, W.; Warga, D.; Wojdan, A.; Woods, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1187. (b) Gilbert, A. M.; Antane, M. M.; Argentieri, T. M.; Butera, J. A.; Francisco, G. D.; Freedon, C.; Gundersen, E. G.; Graceffa, R. F.; Herbst, D.; Hirth, B. H.; Lennox, J. R.; McFarlane, G.; Norton, N. W.; Quagliato, D.; Sheldon, J. H.; Warga, D.; Wojdan, A.; Woods, M. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1203.
- 37) Dwyer, M. P.; Yu, Y.; Chao, J.; Aki, C.; Chao, J.; Biju, P.; Girijavallabhan, V.; Rindgen, D.; Bond, R.; Mayer-Ezel, R.; Jakway, J.; Hipkin, R. W.; Fossetta, J.; Gonsiorek, W.; Bian, H.; Fan, X.; Terminelli, C.; Fine, J.; Lundell, D.; Merritt, J. R.; Rokosz, L. L.; Kaiser, B.; Li, G.; Wang, W.; Stauffer, T.; Ozgur, L.; Baldwin, J.; Taveras, A. G. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7603.
- 38) Dwyer, M. P.; Biju, P. *Curr. Top. Med. Chem.* **2010**, *10*, 1339.
- 39) Shinada, T.; Hayashi, K.; Hayashi, T.; Yoshida, Y.; Horikawa, M.; Shimamoto, K.; Shigeri, Y.; Yumoto, N.; Ohfune, Y. *Org. Lett.* **1999**, *1*, 1663.
- 40) Shinada, T.; Yamasaki, A.; Kiniwa, Y.; Shimamoto, K.; Ohfune, Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4354.
- 41) Campbell, E. F.; Park, A. K.; Kinney, W. A.; Fengl, R. W.; Libeskind, L. S. *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1470.

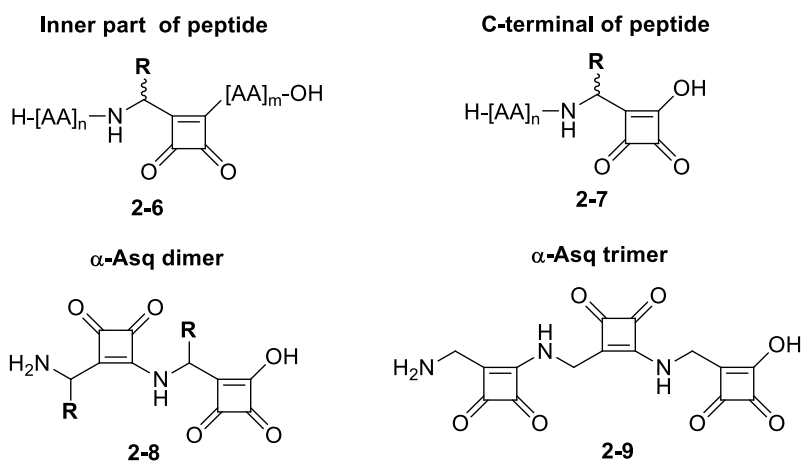
## 第二章 $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成

$\alpha$ -Asq 類のペプチド化の導入位置のパターンは3種類に分類することができる。すなわち、ペプチドの N 末端、内部、C 末端に導入したものである (Figure 2-1, A)。第一章で述べたように、所属研究室は、 $\alpha$ -Asq 含有ペプチド **2-3** ~ **2-5** の合成を達成しており、<sup>1)</sup> ペプチドの N 末端への  $\alpha$ -Asq の導入法は、エンケファリンアナログ **2-3** の合成によって確立されている (Figure 2-1, B)。一方、ペプチド内部への  $\alpha$ -Asq の組み込みは、置換基をもたない SqGly **2-1** を組み込んだエンケファリンアナログ **2-4**, **2-5** の合成に限られ、 $\alpha$  位に置換基をもつ  $\alpha$ -Asq **2-2** を導入した例はない。また ペプチドの C 末端に  $\alpha$ -Asq を導入した例は皆無である。 $\alpha$ -Asq を導入した生理活性ペプチドの合成の幅を広げるためには、ペプチド内における位置を問わず、 $\alpha$  位に置換基をもつ  $\alpha$ -Asq **2-2** を導入できる合成法の開発が望まれる。



**Figure 2-1.** Synthetic example of  $\alpha$ -Asq-containing peptide.

このような現状から、本章では  $\alpha$  位に置換基をもつ  $\alpha$ -Asq **2-2** をペプチドの内部および C 末端に導入したペプチドアナログ **2-6** および **2-7** の合成法の開発について述べる。加えて、 $\alpha$ -Asq の連続連結によるダイマー **2-8** およびトリマー **2-9** の合成について述べる (Figure 2-2)。



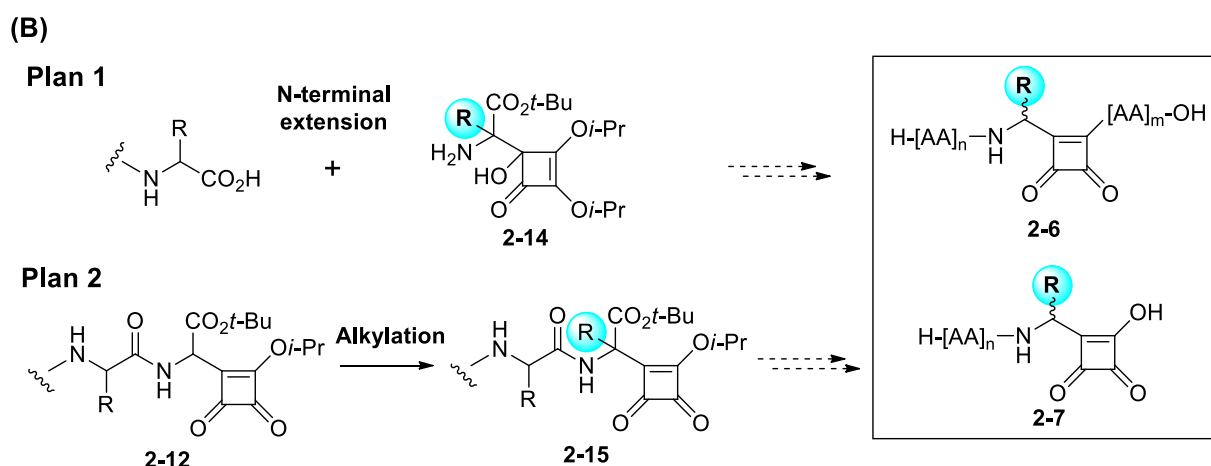
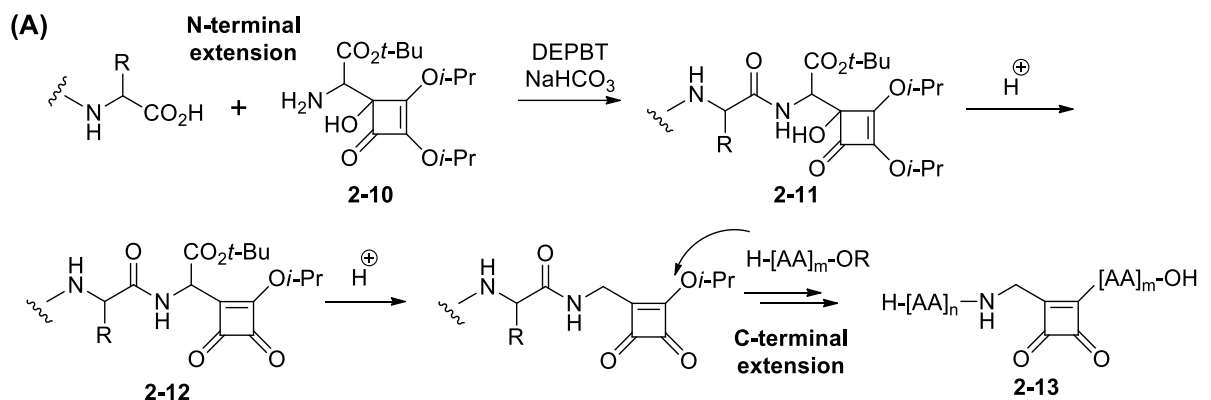
**Figure 2-2.** Target compounds in this chapter.

### 2-1. $\alpha$ -置換- $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成計画と検討

エンケファリンアナログ **2-4**, **2-5** の合成により確立した SqGly のペプチド内への組み込みにおいて、Gly 付加体のヒドロキシシクロブテノン **2-10** のフリーアミンに対して、ペプチド鎖を導入することで、N 末端の伸長が行われた (Scheme 2-1, A)。そして、N 末端伸長後の **2-11** を塩酸処理することにより、Sq-エステル **2-12** とし、その後の *tert*-ブチルエステル基の除去と C 末端の伸長を行うことで SqGly を組み込んだペプチド **2-13** が合成されている。

この合成法を参考にして、 $\alpha$  位に置換基を導入した  $\alpha$ -Asq 含有ペプチド **2-6**, **2-7** の合成は二つの経路を想定して行うことにした (Scheme 2-1, B)。これらのペプチドアナログ **2-6**, **2-7** の合成は、**2-13** の場合とは異なって  $\alpha$ -Asq の  $\alpha$  位に置換基を有するため、この置換基を合成のどの段階で導入するかが鍵となる。まず Plan 1 として、あらかじめ  $\alpha$  炭素に置換基をもつヒドロキシシクロブテノン **2-14** に対する N 末端の伸長を行うことにより、**2-13** の合成と同様の経路によって **2-6** および **2-7** を合成する計画を立てた。また、Plan 2 として、SqGly 含有ペプチド **2-13** の合成と同様にヒドロキシシクロブテノン **2-10** から合成を開始し、N 末端の伸長後に得られる中間体 **2-12** の活性メチン部をアルキル化することによって **2-15** へと導き、 $\alpha$  位に置換基を導入する手法を考えた。<sup>2)</sup>





**Scheme 2-1.**

Plan 1 の検討：ヒドロキシシクロブテノンへの N 末端伸長の検討

まずは、Plan 1 のあらかじめ  $\alpha$  炭素に置換基を備えさせたヒドロキシシクロブテノンからの N 末端伸長を行う手法を検討した (Table 2-1)。Ala, Leu および Phe から 3 種類のヒドロキシシクロブテノン **2-18a-c** の合成を、既知のジアニオンエノラートの付加反応により行った。<sup>3)</sup> Cbz で保護した各アミノ酸エステル **2-16a-c** に対して 2 当量の *sec*-BuLi を作用させてジアニオンエノラートを発生させ、SqA ジエステル **2-17** に付加させることでヒドロキシシクロブテノン体 **2-18a-c** を合成した。得られた **2-18a-c** に対して、それぞれ接触水素化によって Cbz を脱保護した後に、Ac-Ala-OH との縮合による N 末端の伸長を試みた。Gly 付加体のヒドロキシシクロブテノン **2-10** に対する縮合反応は既に確立されており、縮合剤に DEPBT、塩基として炭酸水素ナトリウムを用いたマイルドな条件において、ペプチド鎖のラセミ化を伴うことなく収率良く縮合体 **2-20** が得られている。<sup>4)</sup> 本条件を **2-18a-c** に適用したところ、**2-18a** は 75% 収率で望む縮合体 **2-19a** を与えた。一方で、Leu 付加体 **2-18b** と Phe 付加体 **2-18c** は縮合反応が進行しないことがわかった。このことは、置換基 R が水素やメチル基である **2-10** や **2-18a** に比べて、R がイソブチル基やベンジル基である **2-18b**, **2-18c** はアミノ基周りの立体障害が大きいためであると推察できる。

**Table 2-1.**

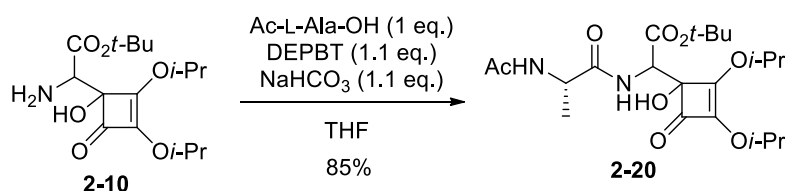
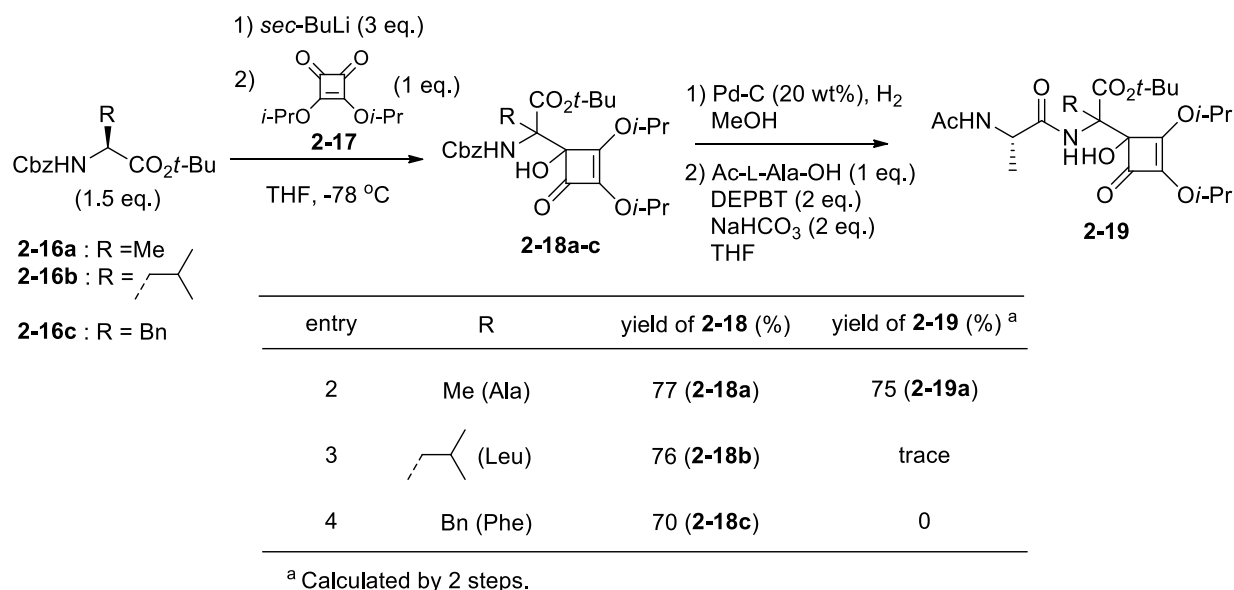


Table 2-1 結果から、 $\alpha$  炭素に置換基をもつヒドロキシシクロブテノン **2-18** からの N 末端の伸長は、Ala 付加体 **2-18a** のような限られた置換基を持つ場合にのみ行える。したがって Plan 1 の手法では、SqLeu および SqPhe を組み込んだペプチドの合成は困難であることが示された。次に Plan 2 の検討を行った。

#### Plan 2 : N 末端伸長後の $\alpha$ 炭素のアルキル化の検討

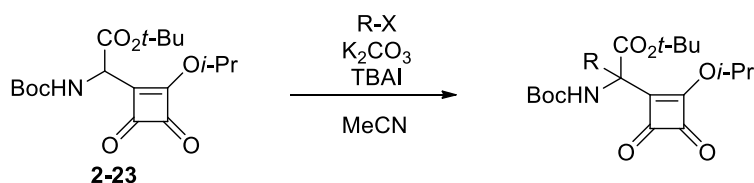
Plan 2 は Gly 付加体のヒドロキシシクロブテノン **2-10** から N 末端のペプチド鎖を伸長後に  $\alpha$  炭素のアルキル化により置換基を導入する手法である。N 末端に Ac-Phe-OH を導入した **2-21** をモデル基質に用いて、アルキル化による置換基の導入を検討した (Table 2-2)。所属研究室では Boc で保護したアミノマロン酸等価体 **2-23** のアルキル化の条件を確立している。<sup>2)</sup> まずは **2-21** に対するベンジル基の導入を、所属研究室で確立された条件と同様に、3 当量の BnBr と 1.5 当量の炭酸カリウムを塩基として用いて行った。しかし、アミノマロン酸等価体 **2-23** のアルキル化の時と比べて、反応に長時間を要した上に臨む生成物 **2-22a** は 44% と低収率であった (entry 1)。そこで求電子剤と塩基の量を増やしたが、収率は 52% にとどまった (entry 2)。過去のアミノマロン酸等価体 **2-23** のアルキル化の際に得られた知見では、本反応は反応後に原料が回収されないことから、アルキル化と塩基による基質の分解反

応が競合していることが示唆された。**2-21** に対するアルキル化が低収率である原因は、N 末端に **Phe** 残基が導入されたことによって、基質が高くなり、アルキル化の速度が低下し、基質の分解へと進んだためであると考えられる。一方で塩基に  $\text{Et}_3\text{N}$  を用いると反応速度が向上し、60% 収率で **2-22a** を得ることができた(entry 3)。反応速度の違いは、有機塩基の  $\text{Et}_3\text{N}$  を用いることで均一系の塩基性条件となり、不均一系の炭酸カリウムアセトニトリルの条件よりも脱プロトン化が効率的に進行したためであると考えられる。同様の条件でイソブテン鎖や酢酸エステルを導入した **2-22b**, **2-22c** を得ることができた(entry 4, 5)。一方で、ヨウ化イソブチルを用いたアルキル化は望む生成物が得られず、基質の分解が生じた(entry 6)。

**Table2-2.**

entry	electrophile (eq.)	Base (eq.)	solv.	time (h)	yield (%)
1	BnBr (3)	$\text{K}_2\text{CO}_3$ (1.5)	MeCN	24	44 ( <b>2-22a</b> )
2	BnBr (8)	$\text{K}_2\text{CO}_3$ (3.0)	MeCN	6	52 ( <b>2-22a</b> )
3	BnBr (8)	$\text{Et}_3\text{N}$ (1.2)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1	60 ( <b>2-22a</b> )
4	(8)	$\text{Et}_3\text{N}$ (1.2)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1	65 ( <b>2-22b</b> )
5	$t\text{-BuO}_2\text{C-CH}_2\text{-Br}$ (8)	$\text{Et}_3\text{N}$ (1.2)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1	70 ( <b>2-22c</b> )
6	(30)	$\text{Et}_3\text{N}$ (1.2)	$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	1	0

<sup>a</sup> Use the same equiv of TBAI relative to the electrophile.

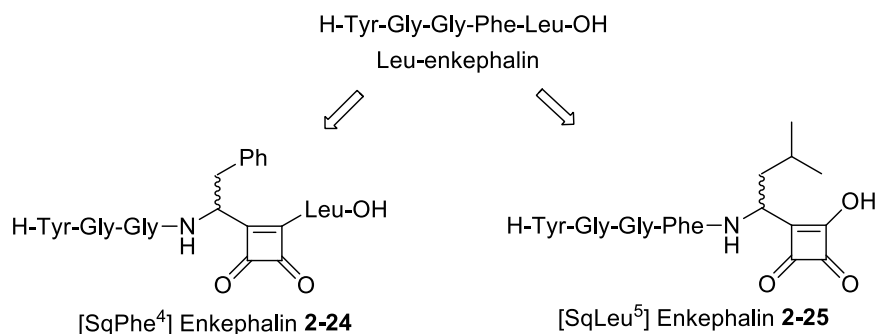


以上の結果により、Plan 2 の N 末端を伸長後にアルキル化を行う手法によって、 $\alpha\text{-Asq}$  の側鎖となる置換基をいくつか導入できた。次に Plan 2 を用いて、**SqPhe** および **SqLeu** を組み込んだペプチドアナログの合成に着手することにした。

## 2-2. エンケファリンアナログの合成

モデル基質を用いた N 末端伸長後のアルキル化に成功したため、 $\alpha$ -置換- $\alpha\text{-Asq}$  **2-2** をペプチド内および C 末端に導入したペプチドアナログの合成を計画した(Figure 2-3)。前述したよ

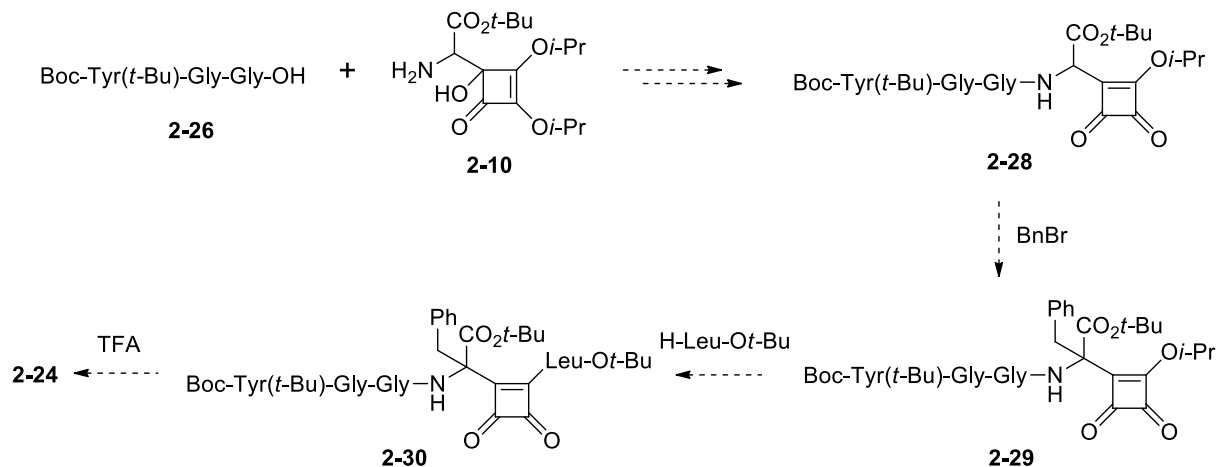
うに、所属研究室では過去にロイシンエンケファリンの左から 3 残基のアミノ酸 (Tyr, Gly, Gly) をそれぞれ  $\alpha$ -Asq に置換したアナログの合成を達成している。<sup>1)</sup> 今回、残り 2 つアミノ酸残基 Phe および Leu 部分をそれぞれと同じ側鎖を導入した SqPhe および SqLeu に置換した新規なエンケファリンアナログ **2-24**, **2-25** の合成を計画した。



**Figure 2-3.** Novel enkephalin analog.

#### [SqPhe<sup>4</sup>] エンケファリン **2-24** の合成

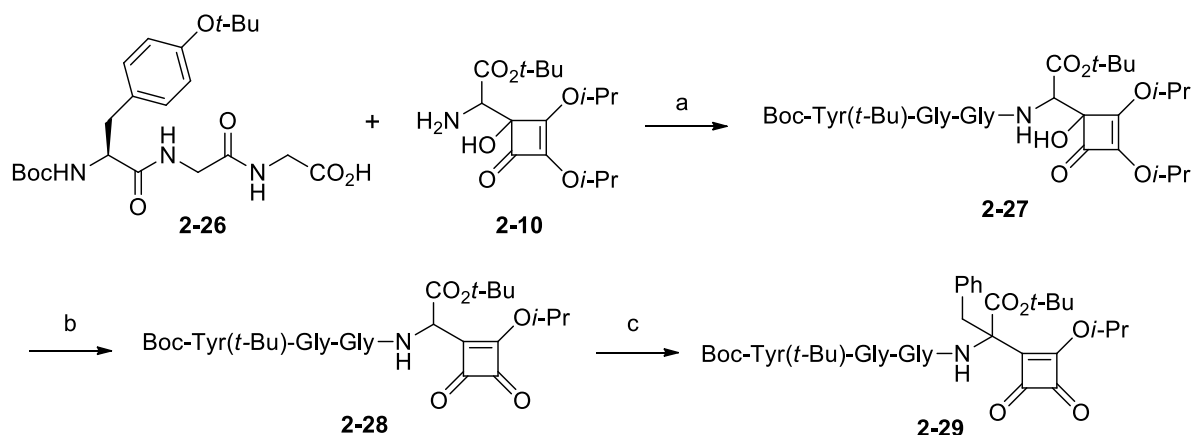
エンケファリンアナログ **2-24** の合成計画を Scheme 2-2 に示した。ヒドロキシシクロブテノン **2-10** をトリペプチド **2-26** と縮合することにより N 末端を伸長した後、酸処理による Sq 基への変換を行い **2-28** とする。**2-28** に対して、SqPhe の側鎖となるベンジル基を導入し **2-29** とした後、C 末端の Leu を導入し **2-30** とする。最後に TFA 処理によってすべての保護基の除去と、*tert*-ブトキシカルボニル基の除去を行い **2-24** を合成する計画である。



**Scheme 2-2.**

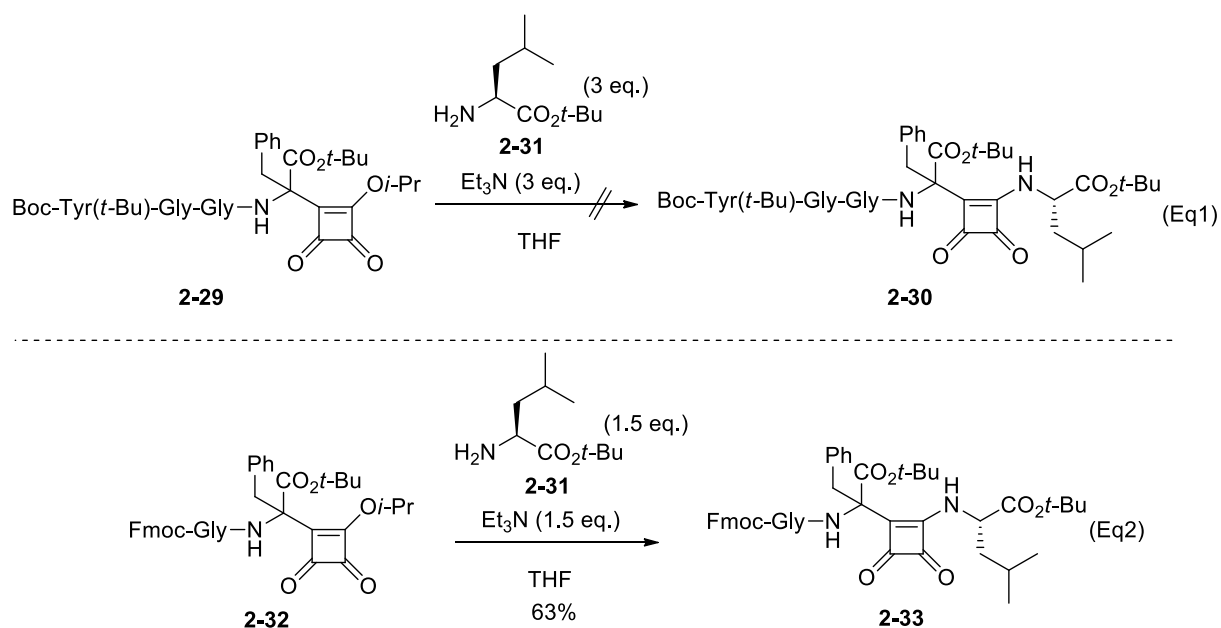
上述の合成計画に従って、[SqPhe<sup>4</sup>] エンケファリン **2-24** の合成を試みた (Scheme 2-3)。まずトリペプチド **2-26** とヒドロキシシクロブテノン **2-10** の縮合により **2-27** とし、続く酸処理によって Sq-エステル **2-28** を得た。次に、過剰量の BnBr を用いた  $\alpha$  位のアルキル化

は、66%収率で **2-29** を与え、SqPhe の側鎖部分を構築できた。



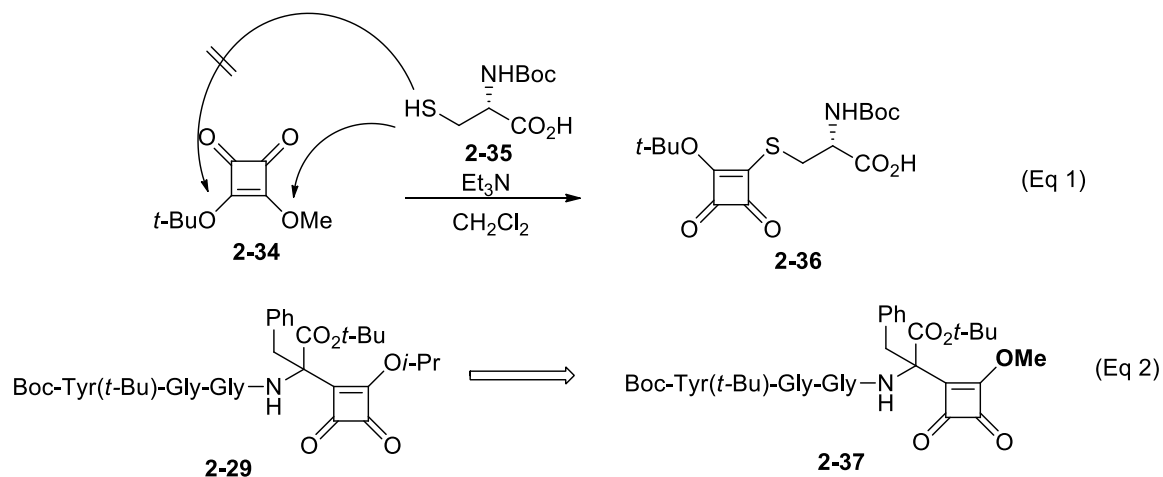
**Scheme 2-3.** (a) DEPBT (1.5 eq.), NaHCO<sub>3</sub> (1.5 eq.), THF, rt, 48 h, 60%; (b) 12N HCl (1 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1.5 h, 66%; (c) BnBr (16 eq.), TBAI (8 eq.), Et<sub>3</sub>N (1.2 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1 h, 66%.

次に、アルキル化した基質 **2-29** の C 末端に H-Leu-Ot-Bu **2-31** の導入を行った(Scheme 2-4)。しかし、3 当量の **2-31** を用いて Et<sub>3</sub>N の存在下反応を行ったが、望むカップリング体 **2-30** は得られなかった(Eq 1)。一方、同じように  $\alpha$  位にベンジル基が導入されたジペプチド型の基質 **2-32** に対して 1.5 当量の **2-31** を用いた反応は、カップリング体 **2-33** を 63% 収率で与えた (Eq-2)。この結果から、テトラペプチド型の **2-29** は反応点である Sq-エステル部がペプチド鎖の巻き込みによって遮蔽され、アミンとの反応が進行しにくくなっている可能性が示唆された。そのため、**2-29** と **2-31** の縮合には、**2-29** の Sq-エステル部の反応性を高める必要があると考えた。



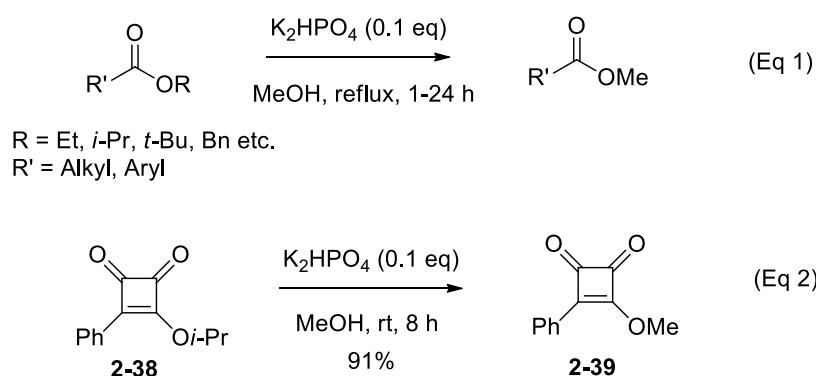
**Scheme 2-4.**

所属研究室では、*tert*-ブチルメチルスクアレート **2-34** と Boc-Cys-OH **2-35** の反応において、メチルエステル側に選択的にチオールが 1,4-付加脱離した Sq-チオエステル **2-36** を与えることを見出している (Scheme 2-5, Eq 1)。<sup>5)</sup> この結果から、より立体的に小さい Sq-メチルエステルは求核種に対する反応性が高いことがわかる。そのため、反応性の低い **2-29** の Sq-イソプロピルエステル部を Sq-メチルエステル **2-37** へと変換することにした (Eq 2)。



**Scheme 2-5.**

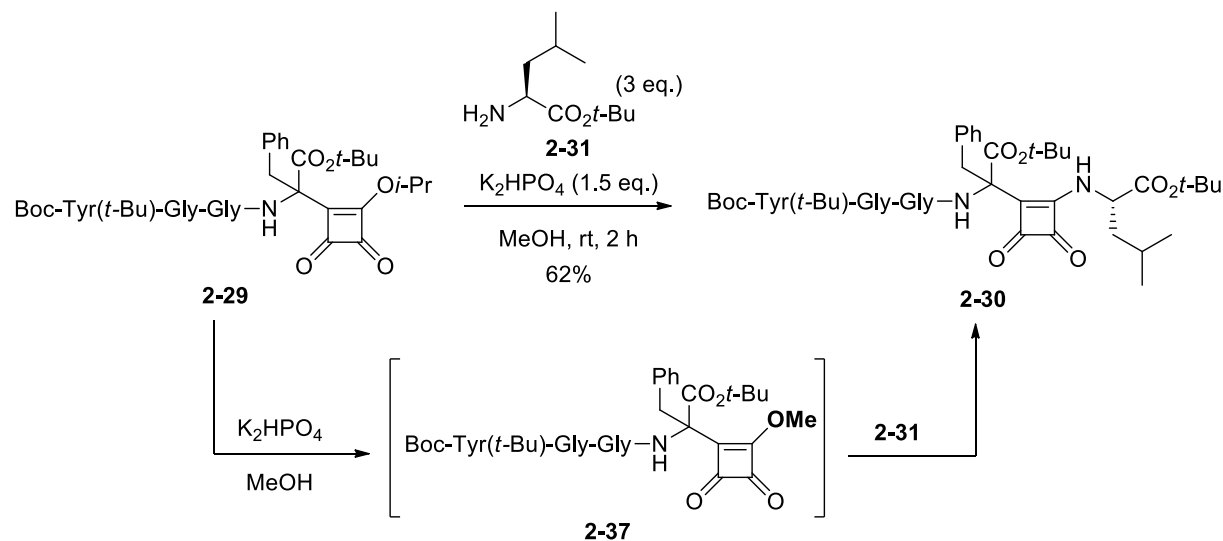
Sq-イソプロピルエステル **2-29** から Sq-メチルエステル **2-37** への変換は、所属研究室により開発された  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  を用いた温和なエステル交換反応の条件を用いることにした。所属研究室では様々なエステル類に対して、メタノール溶媒中、触媒量の  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  の存在下で加熱することで、メチルエステルへと変換できることを報告している (Scheme 2-6, Eq 1)。<sup>6)</sup> 同様の反応を Sq-イソプロピルエステル **2-38** に対して行ったところ、室温下でエステル交換反応が進行し、Sq-メチルエステル **2-39** を与えた (Eq 2)。



**Scheme 2-6.**

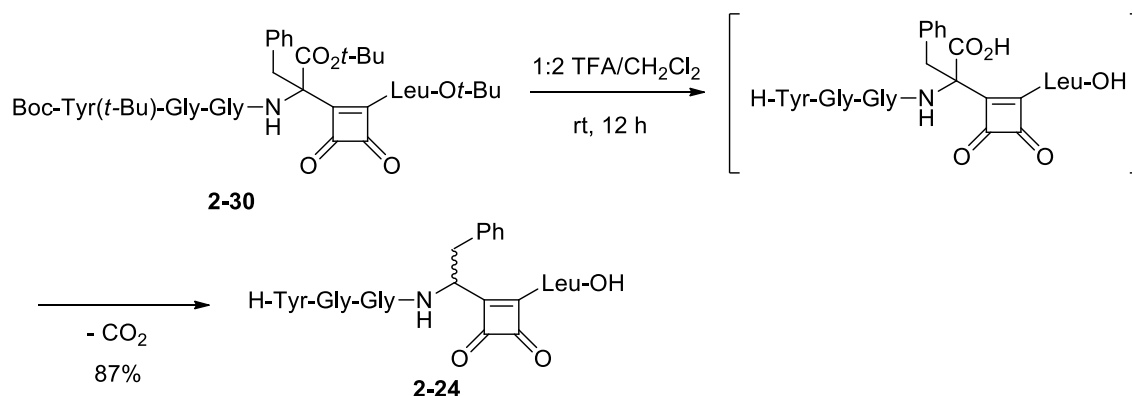
上記の結果から、**2-29** に対してメタノール溶媒中  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  の存在下、Sq-メチルエステルへと変換を試みたが、**2-37** は不安定であり濃縮中に分解することがわかった。そのため、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  と同時に H-Leu-*O**t*-Bu **2-31** を加えることにした。その結果、速やかに反応が進行し、望みの

カップリング体 **2-30** を与えた。これにより、**2-29** の C 末端伸長に成功した(Scheme 2-7)。



**Scheme 2-7.**

得られた **2-30** に対して TFA 処理による全ての保護基の除去を行うと、そのまま室温下において脱炭酸反応が進行し、[SqPhe<sup>4</sup>] エンケファリン **2-24** をジアステレオマーの混合物として得ることができた (Scheme 2-8)。

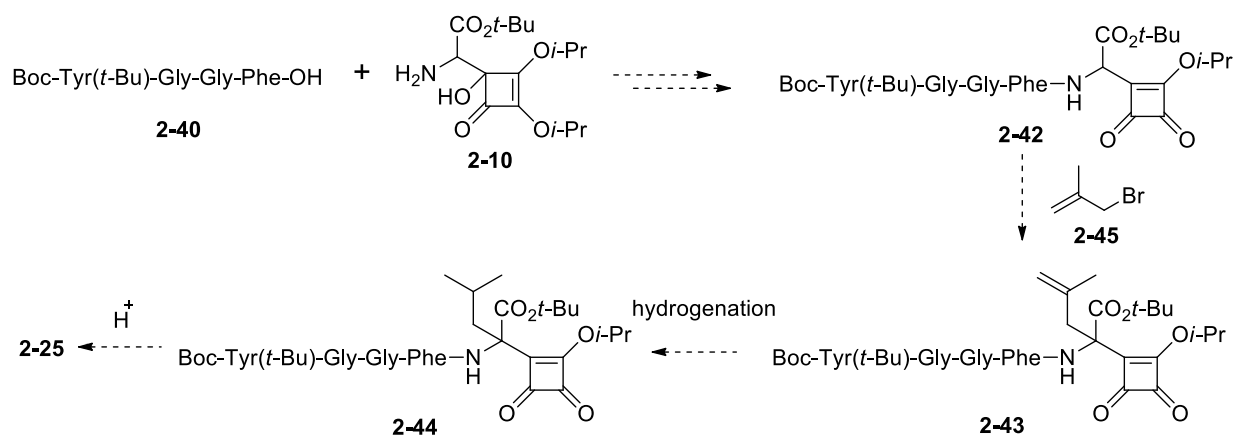


**Scheme 2-8.**

### [SqLeu<sup>5</sup>] エンケファリン **2-25** の合成

エンケファリンの C 末端に SqLeu を導入した [SqLeu<sup>5</sup>] エンケファリン **2-25** の合成計画を Scheme 2-9 に示した。ヒドロキシシクロブテノン **2-10** とテトラペプチド **2-40** の縮合の後に、酸処理による Sq 基への変換によって **2-42** とする。次に **2-42** の  $\alpha$  位炭素に SqLeu の側鎖となるイソブチル基を導入する必要がある。Table 2-2 に示したモデル研究において、ヨウ化イソブチルを用いた側鎖の導入は困難であった。そのため、イソブチル基を導入した **2-44** の合成は、3-ブロモ-2-メチルプロペン **2-45** を用いてイソブテンユニットを導入して **2-43** とした後に、オレフィン部を接触水素化により還元することで行えると考えた。

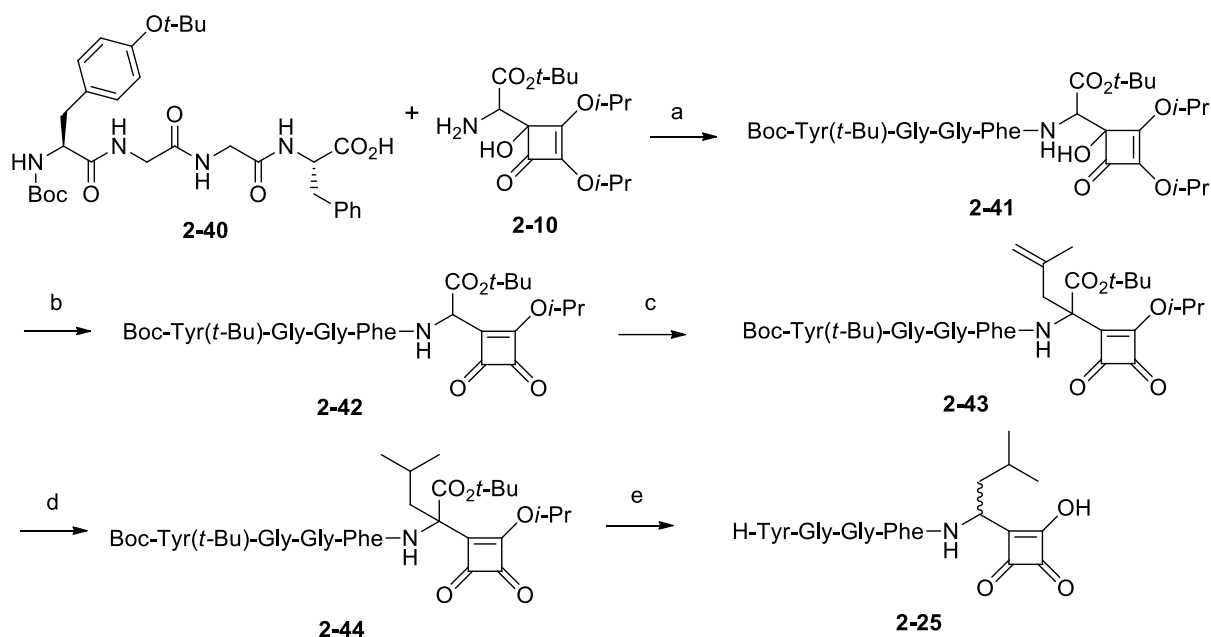
最後に酸処理によって、脱保護を行うことで **2-25** を合成する計画を立てた。



**Scheme 2-9.**

合成計画に従って、[SqLeu<sup>5</sup>] エンケファリン **2-25** の合成を行った(Scheme 2-10)。テトラペプチド **2-40** とヒドロキシシクロプロテノン **2-10** の縮合により **2-41** とし、続く塩酸処理によって Sq-エステル **2-42** へと導いた。**2-42** に対して 3-ブロモ-2-メチルプロペンを用いて  $\alpha$  位にイソブテンユニットを導入し **2-43** とした。次に **2-43** のオレフィン部の還元を試みた。この還元反応はメタノール中、基質に対して 50 wt% の Pearlman 触媒を用いることで達成し、望む **2-44** を得ることができ、SqLeu の側鎖となるイソブチル基を構築できた。最後に濃塩酸とアセトンの混合液で処理することによって、[SqLeu<sup>5</sup>] エンケファリン **2-25** をジアステレオマーの混合物として合成できた。**2-25** は  $\alpha$ -Asq をペプチドの C 末端に導入した初の例である。

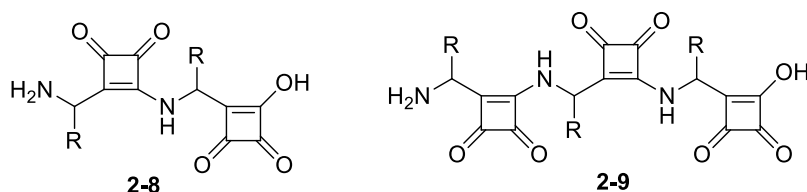




**Scheme 2-10.** (a) DEPBT (1.5 eq.), NaHCO<sub>3</sub> (1.5 eq.), THF, rt, 48 h, 68%; (b) 12*N* HCl (1 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1.5 h, 50%; (c) 3-Bromo-2-methylpropene (24 eq.), TBAI (12 eq.), Et<sub>3</sub>N (1.2 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1 h, 55%; (d) Pearlman's catalyst 20% on Carbon (50 wt%), MeOH, rt, 12 h, 40%; (e) 1:1 12*N* HCl/Acetone, rt, 6 h, 56%.

### 2-3. $\alpha$ -Asq ダイマーおよびトリマーの合成

$\alpha$ -Asq が連続して連結したダイマー **2-8** およびトリマー **2-9** は、天然型のペプチドとは全く異なる構造を有していることが予想され、その構造や生物活性をはじめとする機能に興味をもたれたため、本化合物の合成を計画した (**Figure 2-4**)。

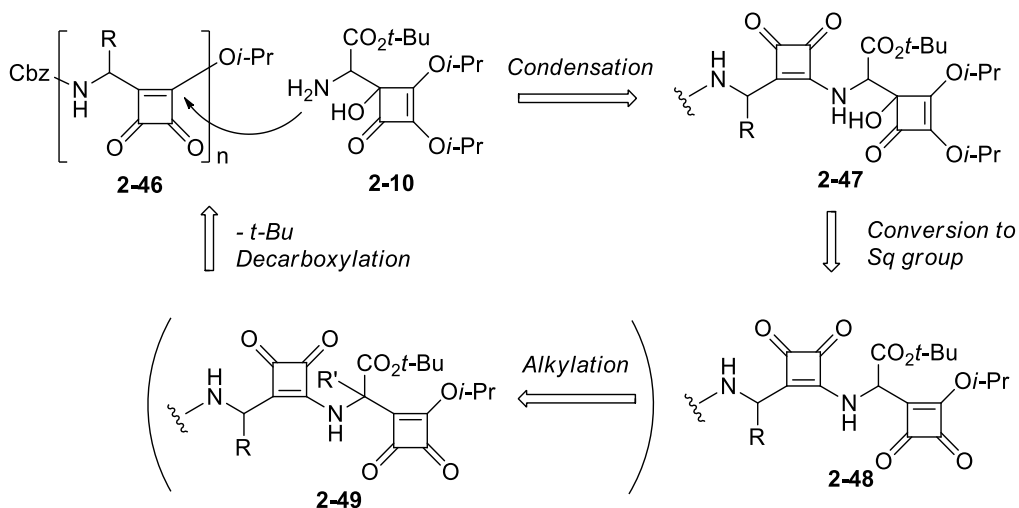


**Figure 2-4.**  $\alpha$ -Asq dimer and trimer.

#### $\alpha$ -Asq オリゴマーの合成計画

$\alpha$ -Asq の連続連結によるオリゴマーの合成計画を Scheme 2-11 に示した。C 末端を伸長可能な  $\alpha$ -Asq エステル **2-46** と N 末端を伸長可能なヒドロキシシクロブテノン **2-10** を縮合させ Sq-アミド **2-47** とする。次にヒドロキシシクロブテノン **2-47** を酸処理により Sq-エス

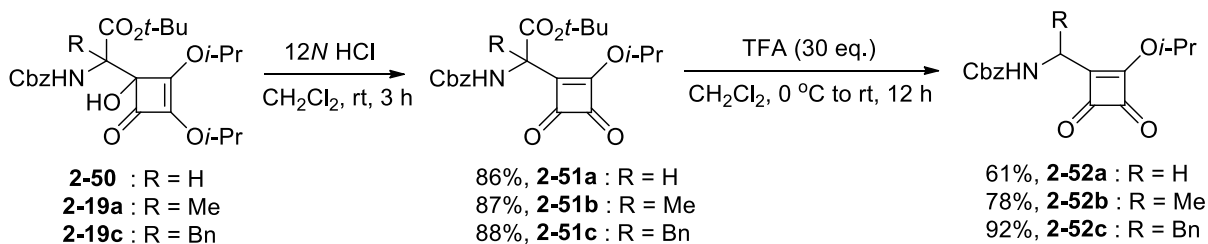
テル **2-48** へと変換する。 $\alpha$  位に置換基を導入する場合は、**2-48** の活性メチン部をアルキル化することにより **2-49** とする。最後に TFA 処理による *tert*-ブトキシカルボニル基の除去を行い  $\alpha$ -Asq ダイマーへと誘導する。このサイクルを繰り返すことで、順次  $\alpha$ -Asq を連結できると考えた。なお、1 残基目の  $\alpha$ -Asq の保護基としては、脱炭酸条件に安定な Cbz 基を用いることにした。



**Scheme 2-11.**

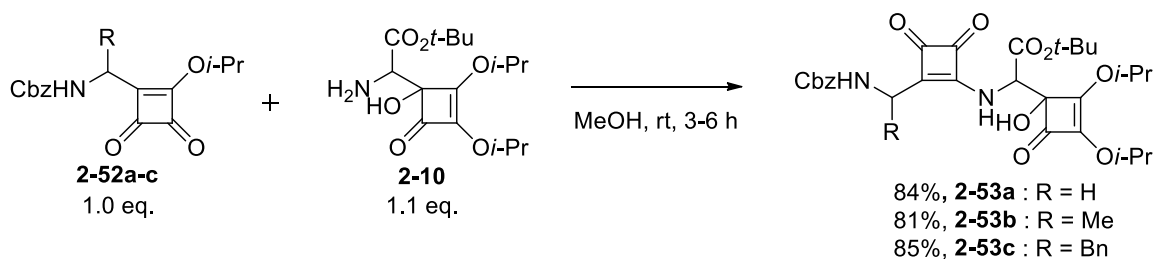
### $\alpha$ -Asq ダイマーの合成

ヒドロキシシクロプロテノン **2-10** のカップリングパートナーとなる Cbz- $\alpha$ -Asq エステル **2-52** の合成を行った (Scheme 2-12)。Gly, Ala および Phe 由来のヒドロキシシクロプロテノン **2-50**, **2-19a**, および **2-19c** を出発物質とし、塩酸処理による Sq-エステルへの変換により、**2-51a-c** とした。続く、TFA 処理による *tert*-ブトキシカルボニル基の除去により、3 種類の Cbz- $\alpha$ -Asq エステル **2-52a-c** を合成した。



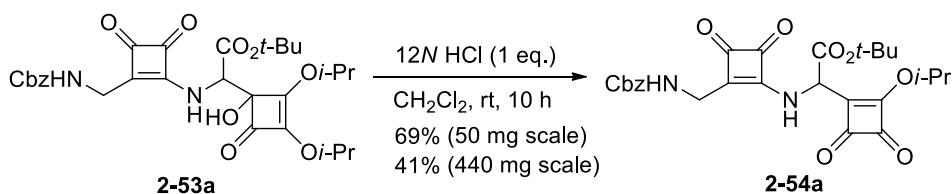
**Scheme 2-12.**

$\alpha$ -Asq エステル **2-52a-c** とヒドロキシシクロプロテノン **2-10** の縮合を行ったところ、速やかに反応が進行し望むカップリング体 **2-53a-c** を良い収率で与えた (Scheme 2-13)。



**Scheme 2-13.**

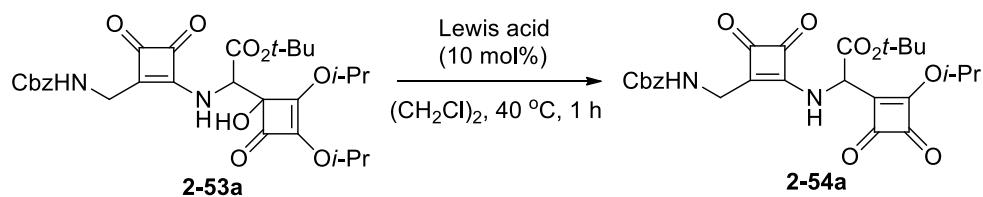
次に **2-53a-c** のヒドロキシシクロブテノン部を Sq-エステルへと変換する必要がある。**2-53a** に対し、従来のジクロロメタン中での塩酸を用いる手法を試みたところ、69%収率で目的の **2-54a** を得ることができた(Scheme 2-14)。しかしながら、本反応はスケールアップすると収率が低下することがわかった。これは、基質が高くなったことと極性の増加による溶解性の低下によって、反応に長時間を要し、Sq-エステル部の加水分解が競合したためであると考えられる。本手法では大量供給が難しく、またより極性が高くなる  $\alpha$ -Asq トリマー **2-9** の合成への適用はさらに厳しくなることが予想されるため、より穏やかな変換法の開発が求められた。



**Scheme 2-14.**

ヒドロキシシクロブテノン **2-53a** から Sq-エステル **2-54a** へのより穏やかな変換法として、種々のルイス酸触媒を用いた反応を試みた (Table 2-3)。反応はジクロロエタン中 40 °C で行い、1 時間後の変換率を  $^1\text{H NMR}$  により算出した。その結果、Au 触媒を用いた場合 **2-54a** の生成は観測されなかった(entry 1,2)。AgOTf, MeReO<sub>3</sub> および Pd(MeCN)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> を用いた場合、**2-54a** の生成は確認されたものの 10% 以下の変換率であった(entry 3-5)。一方で、希土類元素のトリフラート触媒はこの変換反応に対して良い触媒活性を示した。Sc(OTf)<sub>3</sub> および Y(OTf)<sub>3</sub> を用いた場合、1 時間の反応で、原料 **2-53a** がすべて **2-54a** へと変換された(entry 6, 7)。La(OTf)<sub>3</sub> および Sm(OTf)<sub>3</sub> を用いた場合には、1 時間後の変換率はそれぞれ 17% および 45% に留まった(entry 8, 9)。単離収率の比較から Sc(OTf)<sub>3</sub> を最適な触媒に決定し、望む **2-54a** を 83% 収率で得ることができた。

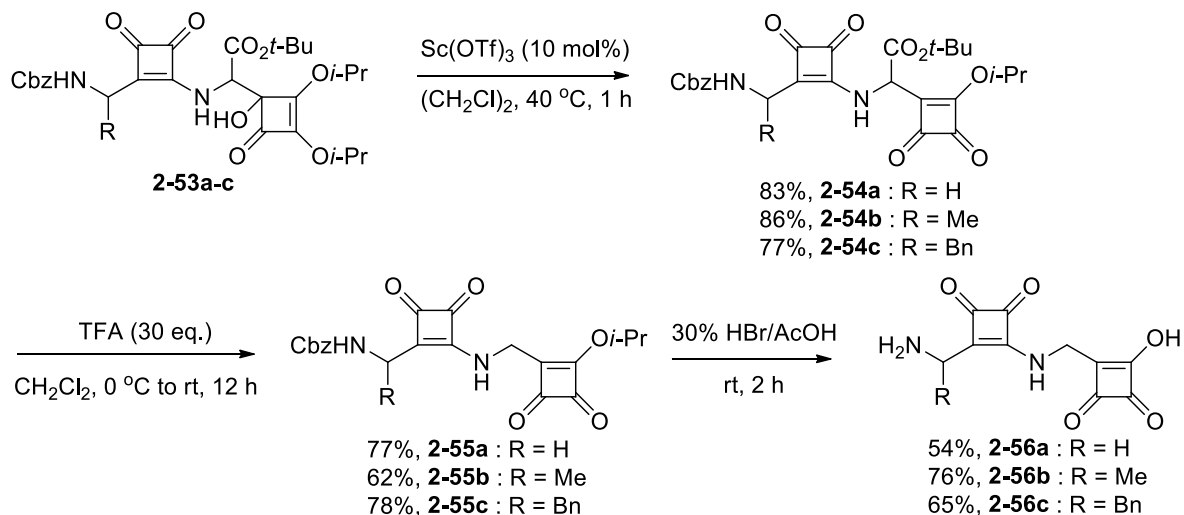
**Table 2-3.**



entry	Lewis acid	conversion (%) <sup>a)</sup>	yield (%)
1	Ph <sub>3</sub> PAuCl	0	-
2	(Ph <sub>3</sub> P) <sub>3</sub> OAu <sub>3</sub> BF <sub>4</sub>	0	-
3	AgOTf	< 5	-
4	MeReO <sub>3</sub>	< 5	-
5	(MeCN) <sub>2</sub> PdCl <sub>2</sub>	10	-
6	Sc(OTf) <sub>3</sub>	100	83
7	Y(OTf) <sub>3</sub>	100	80
8	La(OTf) <sub>3</sub>	17	-
9	Sm(OTf) <sub>3</sub>	45	-

(a) Calculated by <sup>1</sup>H NMR.

Sc(OTf)<sub>3</sub> を用いた変換は **2-53b**, **2-53c** に対しても良い反応性を示し、**2-54b**, **2-54c** を収率良く得ることができた (Scheme 2-15)。**54a-c** を TFA で処理することにより *tert*-ブトキシカルボニル基を除去し、Sq-エステル **2-55a-c** へと導いた。最後に、臭化水素の酢酸溶液により両端の保護基を除去し、3 種類の  $\alpha$ -Asq ダイマー体、SqGly-SqGly **2-56a**、SqAla-SqGly **2-56b**、および SqPhe-SqGly **2-56c** の合成に成功した。



**Scheme 2-15.**

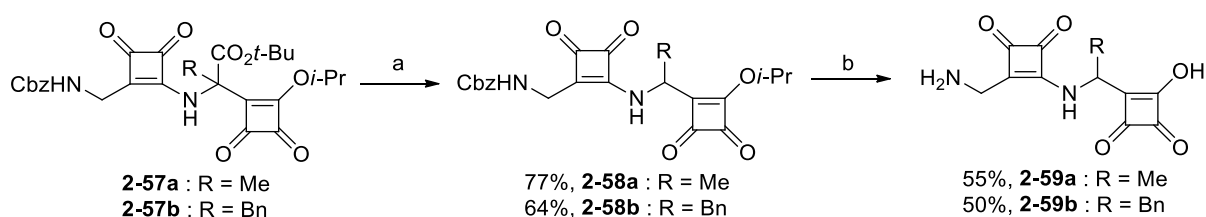
・ **2-54a** のアルキル化

次に **2-54a** を用いて C 末端側の  $\alpha$ -Asq への置換基の導入を試みた (Table 2-4)。炭酸カリウムの存在下、5 当量の臭化アルキルと 5 当量の TBAI を用いることでベンジル基、アリル基および酢酸ユニットの導入に成功した (entry 1-3)。アルキル化剤としてヨウ化メチルを用いた場合には、アルキル化剤の活性化が必要ないと思われたため、TBAI のない条件で行ったが、9% と低収率であった (entry 4)。ヨウ化メチルを用いた場合においても TBAI の添加は効果的であり、63% まで収率を改善することができた (entry 5)。これは TBAI が系中で生じる **2-54a** のエノラートの溶解性を向上させたためであると考えている。

Table 2-4.

entry	R-X (eq.)	TBAI (eq.)	time (h)	yield (%)
1	BnBr (5)	5	4	85 ( <b>2-57b</b> )
2	Br-CH <sub>2</sub> -CH=CH <sub>2</sub> (5)	5	4	64 ( <b>2-57c</b> )
3	Br-CH <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> Bn (5)	5	4	65 ( <b>2-57d</b> )
4	MeI (100)	-	10	9 ( <b>2-57a</b> )
5	MeI (100)	5	10	73 ( <b>2-57a</b> )

得られた **2-57a**, **2-57b** を TFA で処理して、**2-58a**, **2-58b** とし、臭化水素の酢酸溶液により脱保護することで、 $\alpha$ -Asq ダイマー、SqGly-SqAla **2-59a** および SqGly-SqPhe **2-59b** の合成に成功した (Scheme 2-16)。



Scheme 2-16. (a) TFA (30 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0° to rt, 12 h; (b) 30% HBr/AcOH, rt, 2 h.

合成したダイマー体 SqGly-SqGly **2-56a** の DMSO-*d*<sub>6</sub> 中における <sup>1</sup>H NMR を示す (Figure 2-5)。この <sup>1</sup>H NMR から Sq-アミドのプロトンのシグナルが 9-10 ppm の範囲に 2:1 の比で 2 つに分かれて表れており、 $\alpha$  位の二つのメチレン水素のシグナルも 3.8-4.6 ppm に 4 本現れていることがわかる。この <sup>1</sup>H NMR から、**2-56a** は Sq-アミド結合に由来する二つのロータマーの *s-cis* **2-56a** と *s-trans* **2-56a** の混合状態であることがわかった。これらの *s-cis* 体と *s-trans* 体のいずれがメジャー体あるいはマイナー体であるかを明らかにするため、NOE 測定

を行った。その結果、メジャー体の方は二つのメチレン水素の間に相関がみられた。一方で、マイナー体の方には、アミド水素とメチレン水素の間に相関がみられた一方で、メチレン同士の相関は観測されなかった。これより、2:1の存在比で *s-cis* **2-56a** がメジャー体であり、*s-trans* **2-56a** がマイナー体であることがわかった。

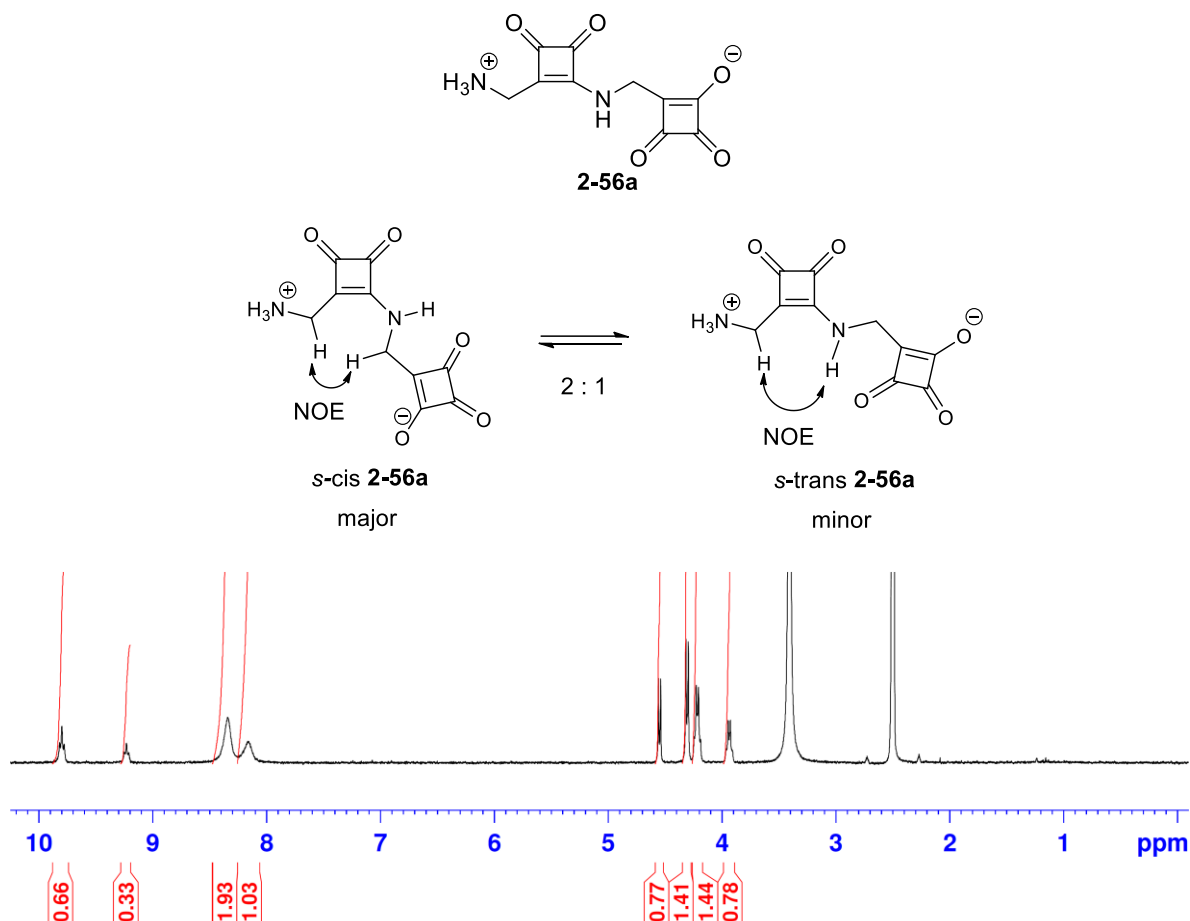
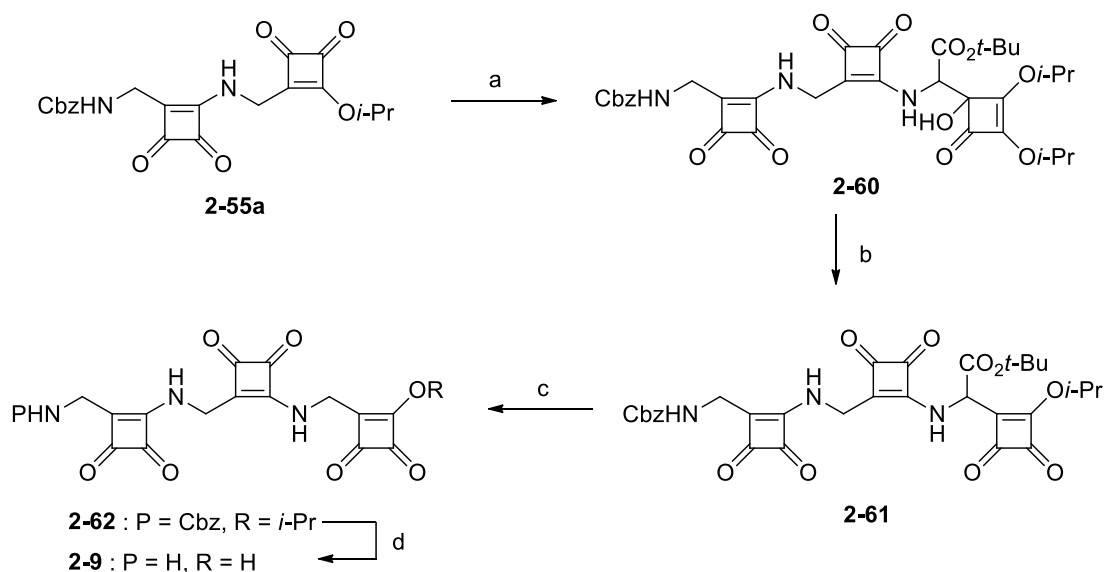


Figure 2-5.  $^1\text{H}$  NMR of SqGly-SqGly **2-56a**

### $\alpha$ -Asq トリペプチドの合成

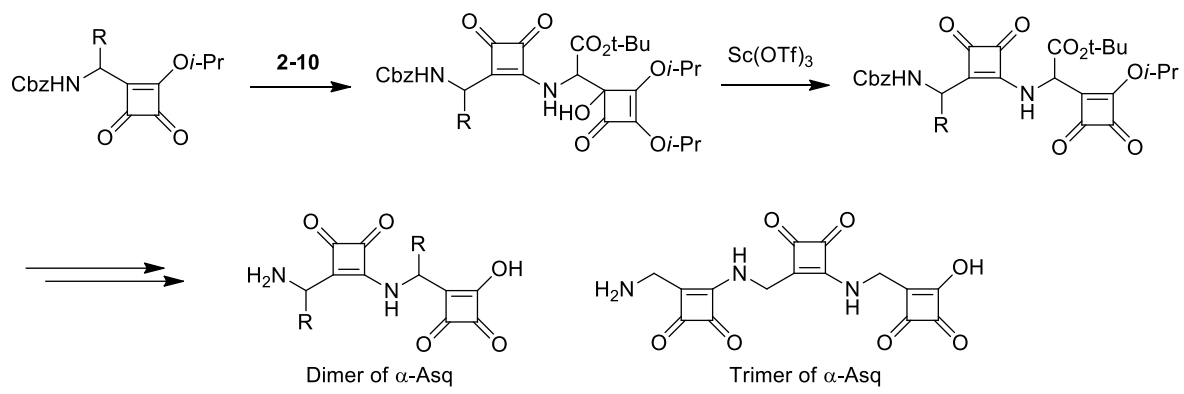
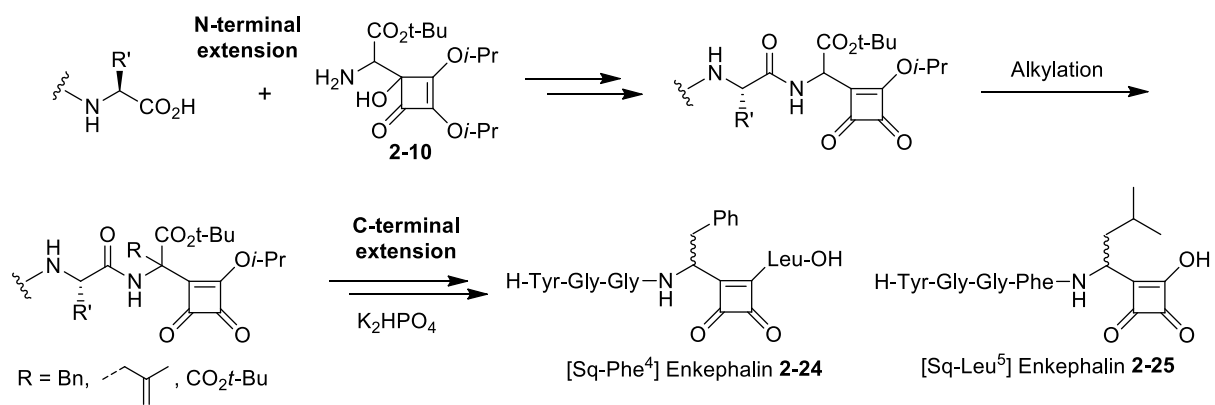
次に  $\alpha$ -Asq ダイマーの合成と同じサイクルを繰り返すことにより、 $\alpha$ -Asq トリマー **2-9** の合成に取り組んだ(Scheme 2-17)。合成した SqGly ジペプチドエステル **2-55a** に対してヒドロキシシクロブテノン **2-10** を 3 当量用いることにより収率よく縮合体 **2-60** を得た。**2-60** を 20 mol% の  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  を用いて 87%の収率で Sq-エステル **2-61** へ変換し、続く TFA 処理によって *tert*-ブトキシカルボニル基を除去し **2-62** とした。最後に、臭化水素の酢酸溶液によって両末端の保護基を除去し、 $\alpha$ -Asq トリマー体 SqGly-SqGly-SqGly **2-9** の合成に成功した。



**Scheme 2-17.** (a) **2-10** (3 eq.), MeOH, rt, 5 h, 86%; (b) Sc(OTf)<sub>3</sub> (20 mol%), (CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub>, 40 °C, 2 h, 83%; (c) TFA (30 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt, 12 h, 77%; (d) 30% HBr/AcOH, rt, 2 h, 45%.

## 第二章のまとめ

本章では  $\alpha$ -Asq のペプチド化について述べた。SqPhe や SqLeu などの  $\alpha$  位に置換基をもつ  $\alpha$ -Asq 類のペプチド化は、グリシン付加したヒドロキシシクロブテノン **2-10** から N 末端側のペプチド鎖を伸長した後に、 $\alpha$ -Asq の  $\alpha$  位のアルキル化による側鎖の導入を行うことで達成した。また、Sq 基側へアミノ酸の導入において、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用いた系中での Sq-エステルのエステル交換によって、Sq-エステル部の反応性を向上させられることを見出した。これらの手法を用いることで、エンケファリンの内部の Phe および C 末端の Leu 残基を SqPhe および SqLeu に置換したアナログ **2-24**, **2-25** の合成に成功した。また、 $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成で N 末端伸長ユニットとして用いたヒドロキシシクロブテノン **2-10** を利用することにより、 $\alpha$ -Asq の繰り返し連結を行った。その結果、5 種類の  $\alpha$ -Asq ダイマーおよび  $\alpha$ -Asq トリマーの合成に成功した。そして、本合成の中で Sc(OTf)<sub>3</sub> 触媒を用いたヒドロキシシクロブテノンの Sq-エステルへの変換反応を見出した。続いて、第三章では固相合成による  $\alpha$ -Asq のペプチド化について述べる。





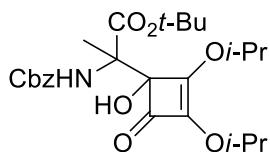
## General Information:

All reagents and solvents were purchased from either Aldrich Chemical Company, Inc., Kanto Kagaku Co., Ltd., Merck & Co., Inc., Nacalai Tesque Company, Ltd., Peptide Institute, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd., Wako Pure Chemical Industries, Ltd., or Watanabe Chemical Industries, Ltd. and used without further purification unless otherwise indicated. Dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) was distilled from phosphoric pentoxide (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Tetrahydrofuran (THF), acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) and *N,N*-dimethylformamide (DMF) of anhydrous grade were used.

Optical rotations were taken on a JASCO P-1030 polarimeter with a sodium lamp (D line). FTIR spectra were measured on a JASCO FT/IR-6200 infrared spectrophotometer. <sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on an either Bruker AVANCE-300 (300 MHz), Bruker AVANCE-400 (400 MHz), Bruker AVANCE-600 (600 MHz) or JEOL JNM-LA 400 (400 MHz) spectrometer. Chemical shifts of <sup>1</sup>H NMR were reported in parts per million (ppm, δ) relative to CHCl<sub>3</sub> (δ = 7.26) in CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>2</sub>HOD (δ = 3.31) in CD<sub>3</sub>OD, HDO (δ = 4.79) in D<sub>2</sub>O, or DMSO-*d*<sub>5</sub> (δ = 2.50) in DMSO-*d*<sub>6</sub>. <sup>13</sup>C NMR spectra were recorded on an either Bruker AVANCE-300 (75 MHz), Bruker AVANCE-400 (100 MHz), Bruker AVANCE-600 (150 MHz) or JEOL JNM-LA 400 (100 MHz) spectrometer. Chemical shifts of <sup>13</sup>C NMR were reported in ppm (δ) relative to CHCl<sub>3</sub> (δ = 77.0) in CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>2</sub>HOD (δ = 49.0) in CD<sub>3</sub>OD, or DMSO-*d*<sub>5</sub> (δ = 39.5) in DMSO-*d*<sub>6</sub>. High resolution mass spectrometry (HRMS) were obtained on an either JEOL JMS-AX500 for fast atom bombardment ionization (FAB), Bruker solariX XR (9.4T) for electrospray ionization (ESI), or matrix assisted laser desorption / ionization (MALDI). α-CHCA was used as matrix for MALDI analysis.

All reactions were monitored by thin layer chromatography (TLC), which was performed with precoated plates (silica gel 60 F-254, 0.25 mm thickness, manufactured by Merck). TLC visualization was accompanied using UV lamp (254 nm), ninhydrin solution (TCI N-094) or phosphomolybdic acid solution (10 g dissolved in 150 mL of EtOH). Daisogel IR-60 1002W (40/63 mm) was used for flash column chromatography on silica gel. Cosmosil® 140C<sub>18</sub>-PREP was used for reversed-phase column chromatography.

***tert*-butyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-(2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl) propanoate (2-18a)**



To a solution of *N*-Cbz-L-Ala-*Ot*-Bu (684 mg, 2.45 mmol) in THF (20 mL) was added *sec*-BuLi (1.05 M solution of cyclohexane, *n*-hexane; 4.67 mL, 4.90 mmol) under argon at -78 °C. The

mixture was stirred for 40 min. To the mixture was added a solution of **2-17** (323 mg, 1.63 mmol) in THF (5 mL) at -78 °C. The mixture was stirred for 1 h at -78 °C, quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl (20 mL), and extracted with EtOAc (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 20/1-3/1) to give **2-18a** (599 mg, 77%, an inseparable mixture of diastereomers (ca. 2:1) as pale yellow oil:

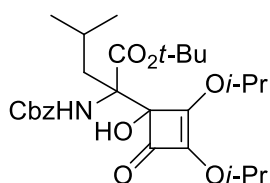
FTIR (neat) 3380, 2980, 2938, 1771, 1732, 1621, 1506, 1460, 1386, 1373, 1318, 1243, 1097, 1051, 954, 907, 728 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41-7.23 (m, 5H), 6.04 (s, 1/3H), 5.82 (s, 2/3H), 5.11 (d, *J* = 12.3 Hz, 1/3H), 5.07 (s, 1/3H), 5.02 (d, *J* = 12.3 Hz, 1/3H), 4.94-4.76 (m, 2H), 1.59 (s, 2H), 1.56 (s, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.45 (s, 6H), 1.39-1.32 (m, 6H), 1.28-1.21 (m, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 181.53, 181.47, 170.5, 170.1, 163.5, 162.6, 155.8, 155.6, 136.12, 136.08, 133.1, 133.0, 128.3, 127.9, 127.8, 87.9, 87.7, 83.4, 83.1, 77.2, 73.7, 73.6, 66.74, 66.71, 62.6, 62.5, 27.6, 27.5, 22.6, 22.4, 22.3, 22.10, 22.07, 19.7, 19.5;

HRMS (FAB) *m/z* (M+H)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>8</sub>+H]<sup>+</sup> 478.2363, found 478.2432.

***tert*-butyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-(2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)-4-methylpentanoate (2-18b)**



According to the procedure for synthesis of **2-18a**, *N*-Cbz-L-Leu-*O*-*t*-Bu (785 mg, 2.45 mmol) was treated with *sec*-BuLi (1.05 M solution of cyclohexane, *n*-hexane; 4.67 mL, 4.90 mmol), followed by addition of **2-17** (323 mg, 1.63 mmol). A crude mixture was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 20/1-3/1) to give **2-18b** (645 mg, 76%, an inseparable mixture of 5:4 diastereomers) as pale yellow oil:

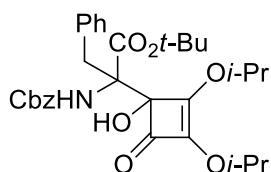
FTIR (neat) 3372, 2936, 1772, 1736, 1621, 1502, 1467, 1391, 1372, 1322, 1241, 1089, 1043, 1033, 729 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.45-7.27 (m, 5H), 6.54 (s, 4/9H), 6.42 (s, 5/9H), 5.20-5.02 (m, 2H), 4.98-4.68 (m, 2H), 2.57 (m, 1H), 2.14 (dd, *J* = 15.0 Hz, 5.7 Hz, 4/9H), 2.00 (dd, *J* = 14.7 Hz, 5.7 Hz, 5/9H), 1.53-1.17 (m, 22H), 0.92-0.81 (m, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 184.0, 182.5, 182.2, 169.7, 169.6, 164.2, 163.8, 157.4, 157.3, 136.1, 136.0, 132.5, 132.3, 128.43, 128.39, 128.1, 128.06, 127.94, 127.90, 90.0, 89.8, 84.5, 84.0, 76.7, 76.5, 73.5, 68.4, 68.1, 67.3, 67.2, 37.69, 37.66, 27.7, 27.5, 25.0, 24.9, 23.7, 23.5, 23.4, 22.8, 22.74, 22.68, 22.4, 22.3, 22.1;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>8</sub>+Na]<sup>+</sup> 542.2730, found 542.2755.

***tert*-butyl 2-(((benzyloxy)carbonyl)amino)-2-(2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)-3-phenylpropanoate (2-18c)**



According to the procedure for synthesis of **2-18a**, *N*-Cbz-L-Phe-*Ot*-Bu (870 mg, 2.45 mmol) was treated with *sec*-BuLi (1.05 M solution of cyclohexane, *n*-hexane; 4.67 mL, 4.90 mmol), followed by addition of **2-17** (323 mg, 1.63 mmol). A crude mixture was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 20/1-3/1) to give **2-18c** (634 mg, 70%, an inseparable mixture of 1:1 diastereomers as pale yellow oil:

FTIR (neat) 3391, 2980, 2981, 1770, 1725, 1687, 1625, 1507, 1456, 1386, 1373, 1318, 1240, 1153, 1098, 1077, 1014, 968, 906, 727, 699  $\text{cm}^{-1}$ ;

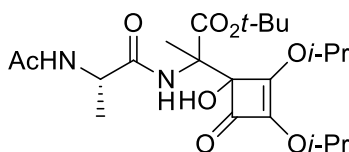
$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.49-7.26 (m, 5H), 7.24-7.05 (m, 5H), 6.32 (s, 1/2H), 6.18 (s, 1/2H), 5.35-4.99 (m, 2H), 4.98-4.68 (m, 2H), 3.95 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1/2H), 3.86 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1/2H), 3.51 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1/2H), 3.42 (d,  $J = 14.4$  Hz, 1/2H), 1.48-1.20 (m, 21H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182.2, 181.8, 168.4, 168.3, 164.1, 163.7, 157.5, 157.4, 136.1, 135.6, 132.6, 132.5, 130.14, 130.08, 128.5, 128.4, 128.2, 128.11, 128.06, 128.05, 128.02, 126.84, 126.81, 89.7, 89.5, 84.8, 84.4, 76.8, 76.6, 73.6, 69.0, 68.7, 67.3, 67.2, 35.7, 35.6, 27.6, 27.5, 22.83, 22.77, 22.75, 22.67, 22.4, 22.2, 22.1;

HRMS (FAB)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{31}\text{H}_{39}\text{NO}_8+\text{H}]^+$  554.2676, found 554.2755.

**Ac-L-Ala-[*tert*-butyl**

**2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)propanoate] (2-19a)**



To a solution of **2-18a** (53 mg, 0.111 mmol) in MeOH (1 mL) was added 20% Pd-C (12 mg) at room temperature. The mixture was stirred under  $\text{H}_2$  for 3 h at room temperature, and filtrated through a celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give amine product (45 mg). The amine was subjected to the next step without purification.

Ac-Ala-OH (15 mg, 0.111 mmol) and  $\text{NaHCO}_3$  (19 mg, 0.222 mmol) were successively added to a solution of amine (45 mg) in THF (1.5 ml) at 0  $^\circ\text{C}$ . DEPBT (66 mg, 0.222 mmol) was added at 0  $^\circ\text{C}$ , and the mixture was stirred for 20 min at 0  $^\circ\text{C}$ . The mixture was warmed to room temperature, and stirred for 3 h. The mixture was quenched with  $\text{H}_2\text{O}$  and extracted with EtOAc (5 mL x 3). The combined organic layers were washed with 1N HCl, sat.  $\text{NaHCO}_3$ , brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ ,

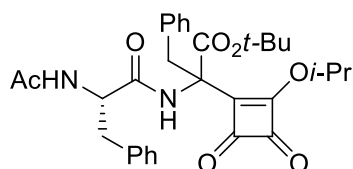
and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/2) to give **2-19a** (38 mg, 75% from **2-18a**, an inseparable 2:1 mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3397, 2980, 1772, 1734, 1623, 1521, 1387, 1369, 1317, 1162, 1099, 1034, 974, 757  $\text{cm}^{-1}$ ;  
 $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.32 (m, 2/3H), 7.20 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1/3), 6.51 (m, 1H), 4.92-4.74 (m, 2H), 4.52 (m, 1H), 1.96 (s, 1H), 1.94 (s, 2H), 1.58 (s, 1H), 1.56 (s, 1H), 1.51 (s, 1H), 1.50-1.45 (m, 9H), 1.42-1.30 (m, 12H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182.2, 182.0, 181.9, 181.6, 173.0, 172.7, 172.5, 172.4, 170.2, 170.1, 170.0, 169.9, 169.8, 169.7, 169.54, 169.46, 163.8, 163.7, 162.8, 133.0, 132.9, 132.7, 132.4, 87.94, 87.88, 87.52, 87.49, 83.5, 83.2, 83.1, 82.8, 73.8, 73.7, 64.6, 64.1, 63.8, 63.6, 48.94, 48.89, 48.86, 48.76, 27.7, 23.03, 23.00, 22.8, 22.7, 22.53, 22.51, 22.4, 22.2, 19.6, 18.8, 18.6, 18.4;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_8+\text{Na}]^+$  479.2369, found 479.2380.

#### Ac-L-Phe-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqPhe]-Oi-Pr (**2-22a**)



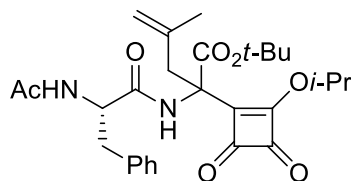
To a solution of **2-21** (15 mg, 0.033 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL) were added benzyl bromide (31  $\mu\text{L}$ , 0.261 mmol) and TBAI (96 mg, 0.261 mmol) at room temperature.  $\text{Et}_3\text{N}$  (5.5  $\mu\text{L}$ , 0.040 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred for 1 h, concentrated *in vacuo*. The residue was filtrated through a celite pad using EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/1) to give **2-22a** (11 mg, 60%, an inseparable 3:2 mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3302, 2983, 1793, 1757, 1684, 1655, 1591, 1507, 1387, 1373, 1337, 1278, 1218, 1151, 1095, 755  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.39-7.10 (m, 8H), 6.91-6.77 (m, 3H), 6.16 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2/5H), 5.96 (d,  $J = 8.1$  Hz, 3/5H), 5.47 (m, 1H), 4.76 (q,  $J = 7.5$  Hz, 2/5H), 4.69 (q,  $J = 7.2$  Hz, 3/5H), 3.77 (d,  $J = 13.8$  Hz, 3/5H), 3.75 (d,  $J = 13.8$  Hz, 2/5H), 3.57 (d,  $J = 13.8$  Hz, 2/5H), 3.41 (d,  $J = 13.5$  Hz, 3/5H), 3.19-2.91 (m, 2H), 1.97 (s, 6/5H), 1.91 (s, 9/5H), 1.50-1.34 (m, 15H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195.9, 195.5, 193.8, 193.5, 191.14, 191.10, 178.6, 178.4, 170.3, 170.2, 170.1, 169.8, 166.2, 165.9, 136.7, 136.5, 133.9, 133.8, 130.1, 129.9, 129.5, 129.4, 128.7, 128.6, 128.5, 128.3, 127.6, 127.5, 127.1, 126.9, 85.1, 84.9, 80.2, 80.1, 63.6, 63.2, 54.2, 53.8, 38.3, 37.9, 37.7, 37.0, 27.8, 23.1, 23.0, 22.9, 22.8, 22.74, 22.66;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{31}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7+\text{Na}]^+$  571.2420, found 571.2423.

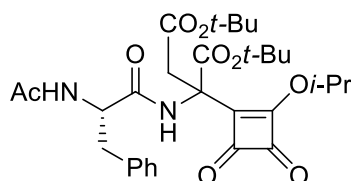
**Ac-L-Phe-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl) $\Delta$ SqLeu]-O*i*-Pr (2-22b)**

To a solution of **2-21** (40 mg, 0.087 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) were added 3-bromo-2-methylpropene (70  $\mu$ L, 0.697 mmol) and TBAI (257 mg, 0.697 mmol) at room temperature. Et<sub>3</sub>N (15  $\mu$ L, 0.104 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred for 1 h, concentrated *in vacuo*. The residue was filtrated through a celite pad using EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-1/2) to give **2-22b** (29 mg, 65%, an inseparable 5:4 mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid: FTIR (neat) 3297, 2983, 1794, 1757, 1652, 1591, 1498, 1389, 1371, 1331, 1280, 1152, 1096, 907, 758 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.34 (s, 4/9H), 7.33-7.15 (m, 5H), 7.00 (s, 5/9H), 6.08 (m, 1H), 5.46 (m, 1H), 4.85-4.70 (m, 2H), 4.64 (m, 1H), 3.24 (dd, *J* = 14.0 Hz, 5.6 Hz, 1H), 3.14 (m, 1H), 3.05-2.93 (m, 1H + 4/9H), 2.84 (d, *J* = 14.4 Hz, 5/9H), 1.97 (s, 4/3H), 1.94 (s, 5/3H), 1.59 (s, 5/3H), 1.58 (s, 4/3H), 1.49-1.37 (m, 15H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  195.6, 195.2, 193.8, 193.6, 191.11, 191.05, 179.1, 179.0, 170.3, 170.2, 170.0, 169.9, 166.70, 166.68, 139.0, 138.9, 136.7, 136.6, 129.4, 129.2, 128.63, 128.56, 127.0, 126.8, 127.1, 126.8, 84.8, 84.6, 80.1, 80.0, 62.3, 61.8, 53.9, 53.8, 40.7, 40.3, 37.7, 37.0, 27.7, 23.04, 23.01, 22.95, 22.82, 22.79, 22.75, 22.72;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>+Na]<sup>+</sup> 535.2420, found 535.2413.

**Ac-L-Phe-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqAsp(O*t*-Bu)]-O*i*-Pr (2-22c)**

To a solution of **2-21** (45 mg, 0.098 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) were added *tert*-butyl bromoacetate (115  $\mu$ L, 0.784 mmol) and TBAI (289 mg, 0.784 mmol) at room temperature. Et<sub>3</sub>N (16  $\mu$ L, 0.118 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred for 1 h, concentrated *in vacuo*. The residue was filtrated through a celite pad using EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-1/1) to give **2-22c** (39 mg, 70%, an inseparable 3:2 mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3307, 2983, 1796, 1755, 1655, 1594, 1498, 1370, 1283, 1249, 1151, 1096, 756 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.53 (s, 2/5H), 7.43 (s, 3/5H), 7.30-7.10 (m, 5H), 6.01 (m, 1H), 5.44 (sept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.81 (q, *J* = 7.2 Hz, 2/5H), 4.77 (q, *J* = 7.2 Hz, 3/5H), 3.50 (d, *J* = 16.8 Hz,

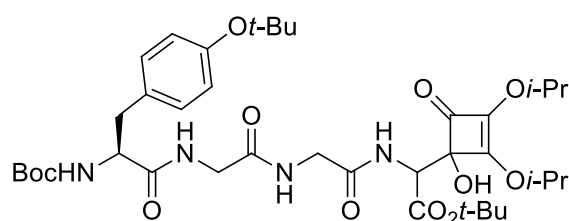
2/5H), 3.47 (d,  $J = 16.8$  Hz, 3/5H), 3.44 (d,  $J = 16.8$  Hz, 2/5H), 3.28 (d,  $J = 16.8$  Hz, 3/5H), 3.19 (dd,  $J = 14.0$  Hz, 6.0 Hz, 2/5H), 3.13 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 6.0 Hz, 3/5H), 3.03 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 7.2 Hz, 3/5H), 2.92 (dd,  $J = 14.0$  Hz, 7.2 Hz, 2/5H), 1.95 (s, 6/5H), 1.94 (s, 9/5H), 1.51-1.30 (m, 24H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195.4, 195.3, 193.4, 193.1, 190.7, 177.0, 176.6, 170.33, 170.28, 169.8, 169.7, 168.54, 168.48, 165.53, 165.51, 136.4, 136.3, 129.31, 129.26, 128.6, 128.5, 126.94, 126.89, 84.8, 84.6, 82.2, 82.1, 80.44, 80.40, 60.2, 60.0, 53.7, 53.5, 38.1, 37.9, 37.7, 37.5, 28.0, 27.9, 27.6, 23.0, 22.70, 22.68;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9+\text{Na}]^+$  595.2632, found 595.2645.

### Boc-L-Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-

[*tert*-butyl 2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)acetate] (2-27)



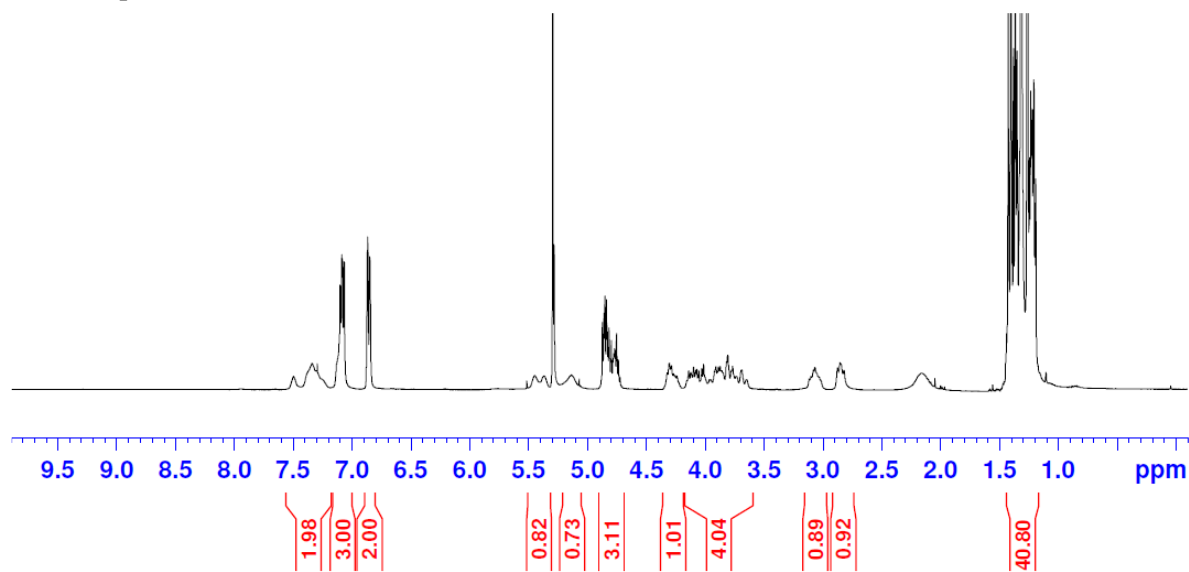
To a mixture of tripeptide **2-26** (474 mg, 1.05 mmol), amine **2-10** (380 mg, 1.16 mmol) in THF (10 mL) was added  $\text{NaHCO}_3$  (132 mg, 1.57 mmol) and DEPBT (470 mg, 1.57 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 48 h at room temperature. The mixture was quenched with  $\text{H}_2\text{O}$  (15 mL) and extracted with EtOAc (10 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 2/1-0/1) to give **2-27** (481 mg, 60%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3380, 2980, 2938, 1771, 1732, 1621, 1506, 1460, 1386, 1373, 1318, 1243, 1097, 1051, 954, 907, 728  $\text{cm}^{-1}$ ;

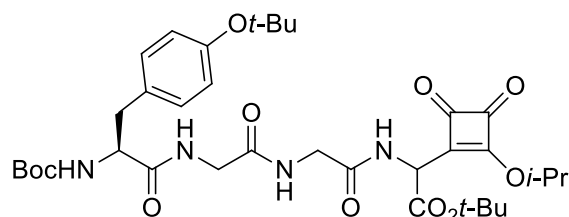
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CD}_2\text{Cl}_2$ )  $\delta$  183.2, 183.0, 173.4, 173.3, 171.2, 170.5, 170.2, 170.0, 169.9, 168.4, 168.3, 168.2, 164.9, 164.7, 157.1, 156.6, 155.0, 132.9, 132.8, 132.1, 131.9, 130.3, 124.7, 85.9, 85.7, 83.6, 81.2, 81.2, 80.9, 78.8, 78.8, 78.5, 78.3, 78.3, 74.5, 74.5, 57.9, 57.7, 57.3, 57.0, 43.9, 43.7, 43.7, 43.7, 43.6, 37.7, 29.2, 28.6, 28.2, 23.1, 23.1, 23.1, 23.0, 23.0, 22.9, 22.9, 22.7, 22.6;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{N}_4\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  785.3949, found 785.3942.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-27** in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



**Boc-L-Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-*Oi*-Pr (**2-28**)**



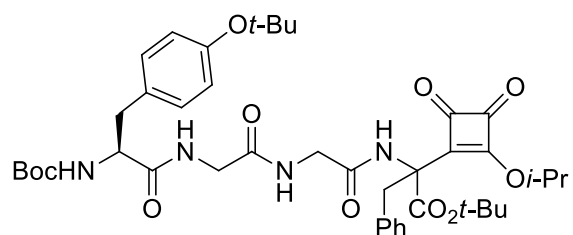
To a solution of **2-27** (451 mg, 0.591 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) was added 12 *N* HCl (57.0  $\mu$ L, 0.609 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 1 h. The mixture was quenched with NaHCO<sub>3</sub>, and filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-0/1) to give **2-28** (274 mg, 66%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3305, 2979, 2930, 1799, 1751, 1653, 1596, 1507, 1391, 1368, 1237, 1160, 1094, 1020, 900, 756 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.54 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 7.23 (br s, 1H), 7.09 (dd, *J* = 8.4 Hz, 1.8 Hz, 2H), 6.97 (br s, 1H), 6.91 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.55 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.45 (sept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.19 (br s, 1H), 4.26 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.18-3.72 (m, 5H), 3.10 (m, 1H), 3.06 (m, 1H), 1.52-1.20 (m, 33H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.8, 196.7, 193.21, 193.16, 192.2, 173.8, 172.6, 172.5, 169.7, 169.0, 164.8, 156.0, 154.40, 154.37, 131.1, 129.6, 124.4, 84.6, 84.5, 80.7, 80.6, 78.5, 56.5, 50.11, 50.07, 43.2, 42.8, 37.1, 28.8, 28.2, 27.8, 22.8, 22.7;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>35</sub>H<sub>50</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>+Na]<sup>+</sup> 725.3374, found 725.3362.

**Boc-L-Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqPhe]-*Oi*-Pr (2-29)**

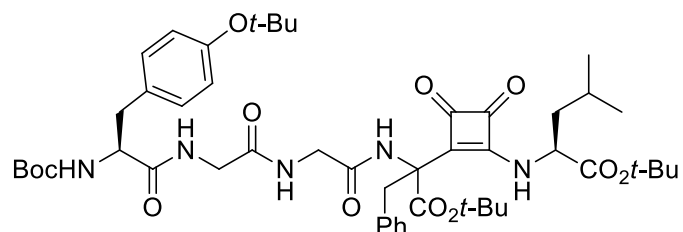
To a solution of **2-28** (250 mg, 0.356 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) were added benzyl bromide (0.676 mL, 5.69 mmol) and TBAI (1.05 g, 2.84 mmol) at room temperature. Et<sub>3</sub>N (60  $\mu$ L, 0.427 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred for 1 h, concentrated *in vacuo*. The residue was filtrated through a celite pad using EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-1/5) to give **2-29** (185 mg, 66%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3303, 2983, 1793, 1746, 1680, 1667, 1593, 1507, 1389, 1368, 1235, 1161, 1098, 1020, 900, 755 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.30-7.18 (m, 5H), 7.10-7.02 (m, 4H), 6.90-6.77 (m, 3H), 5.45 (sept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.42 (d, *J* = 5.7 Hz, 1H), 4.26 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.15-3.91 (m, 2H), 3.91-3.70 (m, 3H), 3.57 (dd, *J* = 13.8 Hz, 3.3 Hz, 1H), 3.06 (m, 1H), 2.87 (m, 1H), 1.49-1.22 (m, 33H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  195.8, 195.7, 193.4, 191.6, 191.5, 178.1, 172.2, 169.5, 168.4, 166.3, 155.9, 154.4, 134.1, 134.0, 131.3, 130.2, 129.6, 128.4, 127.6, 124.3, 85.1, 80.5, 80.4, 78.5, 63.6, 63.5, 59.1, 56.5, 43.1, 43.0, 42.9, 38.0, 37.3, 28.8, 28.3, 27.8, 24.2, 22.8, 22.7, 19.8, 13.7;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>+Na]<sup>+</sup> 815.3843, found 815.3816.

**Boc-L-Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqPhe]-L-Leu-*Ot*-Bu (2-30)**

To a mixture of **2-29** (70.0 mg, 0.0883 mmol) and L-Leu-*Ot*-Bu (50 mg, 0.265 mmol) in MeOH (1 mL) was added K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (23.0 mg, 0.132 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 2 h and quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl (1 mL), extracted with EtOAc (3 mL x 3). The combined organic layers were washed with 1N HCl (5 mL), sat. NaHCO<sub>3</sub> (5 mL), brine (5 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 1/1-0/1) to give **2-30** (52.0 mg, 64%, an inseparable mixture of diastereomers) as a pale yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3308, 2978, 1785, 1734, 1668, 1609, 1507, 1368, 1240, 1156, 755 cm<sup>-1</sup>;

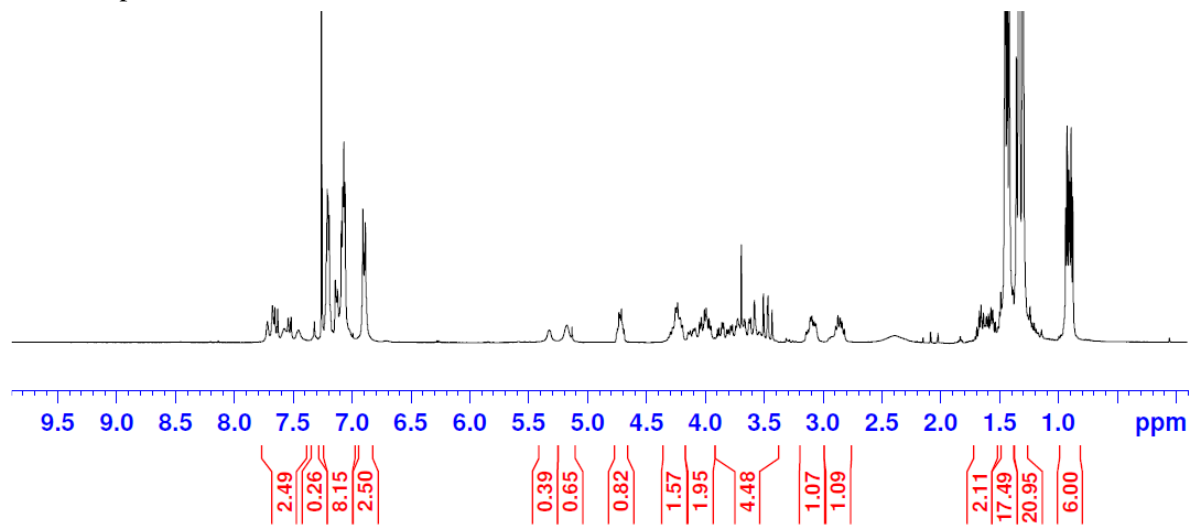
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  192.2, 192.1, 189.7, 189.6, 180.9, 180.8, 172.7, 172.6, 172.1, 170.2,



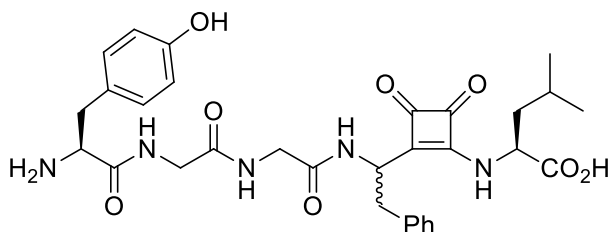
170.1, 170.1, 170.0, 169.9, 169.2, 168.9, 168.8, 168.8, 168.7, 165.6, 156.3, 156.0, 154.4, 133.7, 131.1, 130.1, 130.1, 129.6, 128.4, 128.3, 127.5, 124.3, 84.4, 84.4, 82.7, 82.7, 80.6, 80.5, 78.4, 64.3, 64.2, 56.6, 56.0, 55.8, 52.2, 43.2, 43.1, 42.9, 42.4, 42.2, 41.0, 40.2, 40.1, 36.9, 28.8, 28.2, 27.9, 27.9, 27.7, 27.6, 24.7, 24.6, 22.7, 21.8, 21.7

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>49</sub>H<sub>69</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 942.4840, found 942.4814.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-30** in CDCl<sub>3</sub>.



#### [SqPhe<sup>4</sup>] Enkephalin (**2-24**)



To a solution of **2-30** (24 mg, 0.0261 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was added TFA (1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 12 h, and concentrated *in vacuo*. The residue was washed with Et<sub>2</sub>O (1 mL x 2). The pale yellow powder was then dried under high vacuum. **2-24** (14 mg) was obtained in 87% yield as a mixture of 4:5 two diastereomers.

FTIR (neat) 2959, 1785, 1733, 1678, 1604, 1519, 1430, 1253, 1202, 1142, 1027 cm<sup>-1</sup>;

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>+Na]<sup>+</sup> 630.2540, found 630.2534.

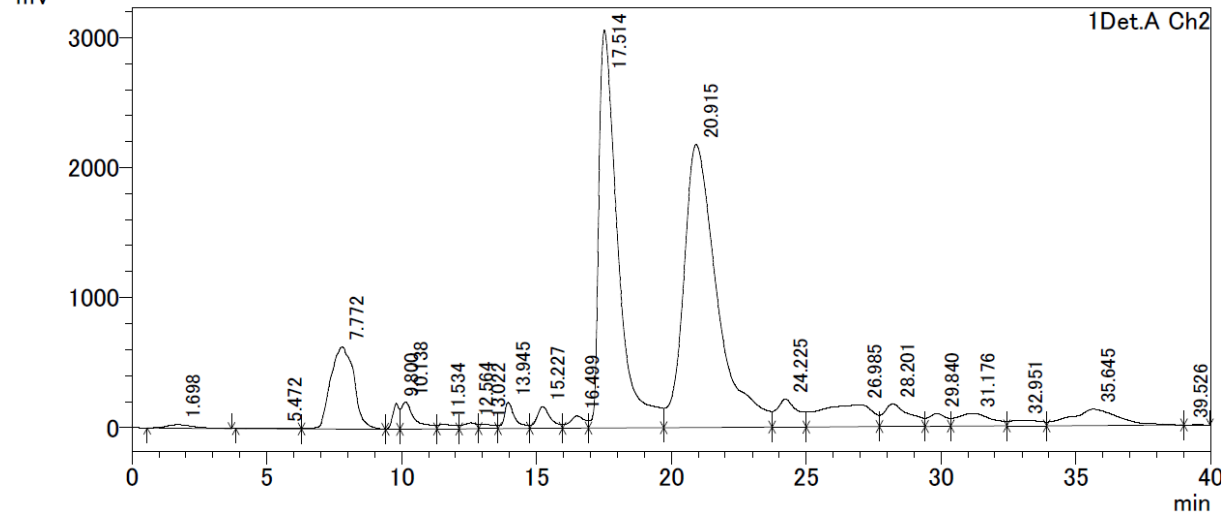
*Separation of two diastereomers (2-24a and 2-24b) by RP-HPLC.*

Column: Nacalai Cosmosil 5C<sub>18</sub>-MS- II, Column Size : 20 x 250 mm

Flow: Iso, 33% MeCN (0.1% TFA)/H<sub>2</sub>O (0.1% TFA) 6 mL/min, temp.: 25 °C

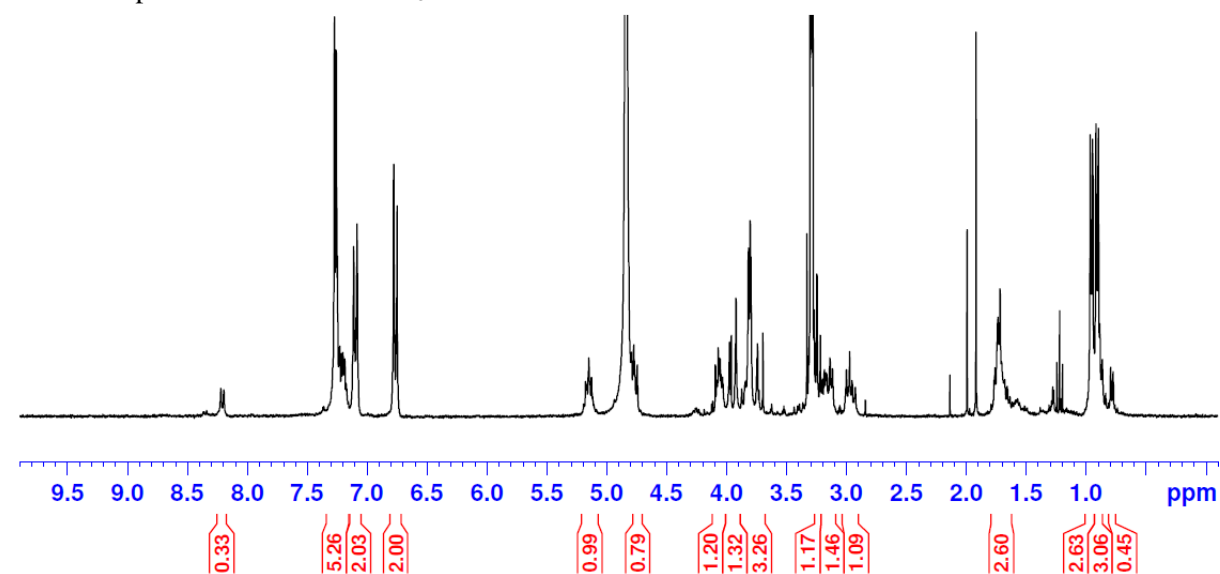
Detection: UV 254 nm

RP-HPLC chart of **2-24**. (**2-24a** : retention time at 17.5 min, **2-24b** : retention time at 20.9 min)

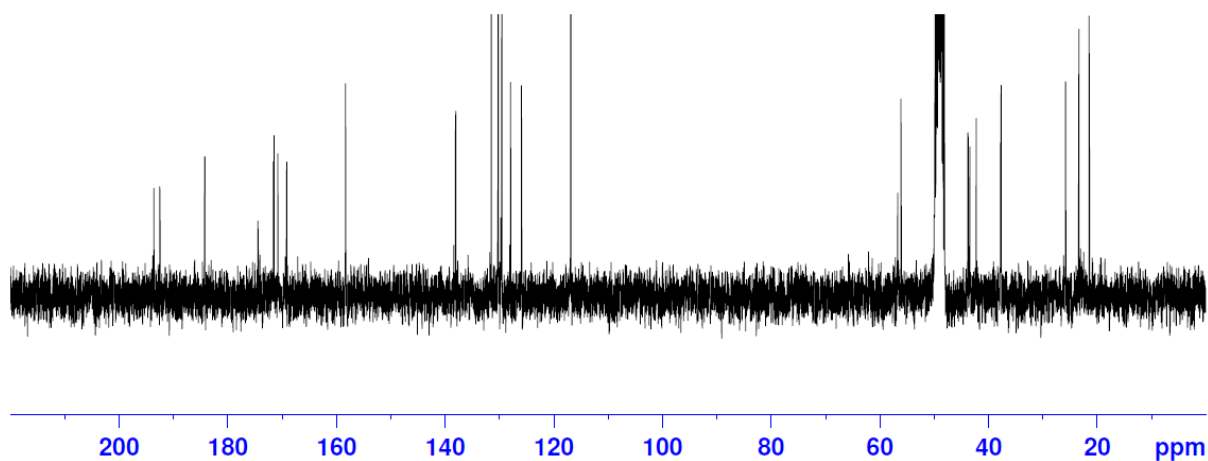


NMR signals of **2-24a** and **2-24b** are multiple because of the presence of two rotamers arising from the N-Sq bond. <sup>1)</sup>

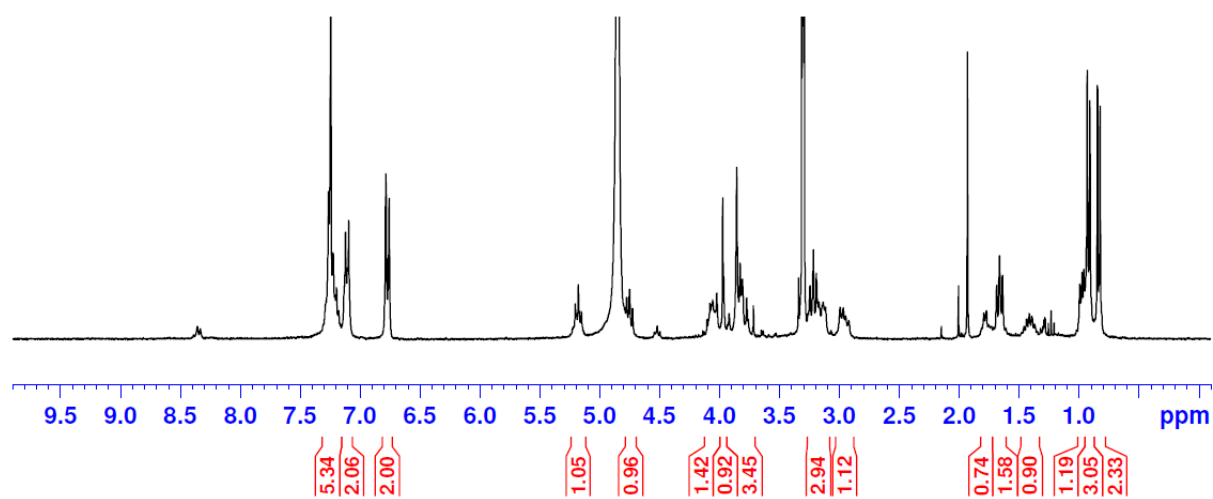
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-24a** in CD<sub>3</sub>OD.



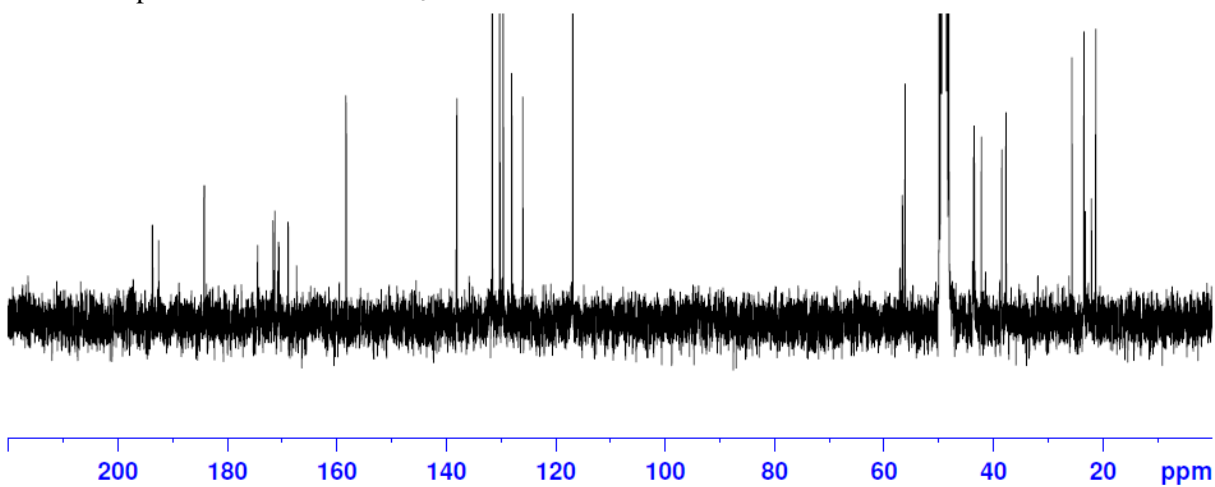
$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **2-24a** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

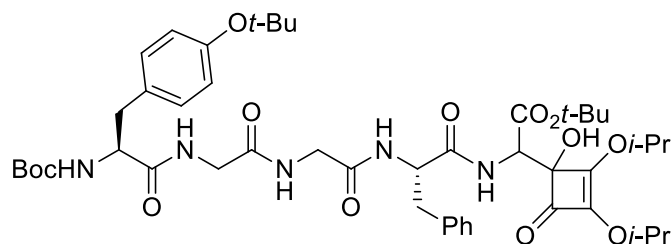


$^1\text{H}$  NMR spectrum of **2-24b** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



$^{13}\text{C}$  NMR spectrum of **2-24b** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Boc-L-Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-L-Phe-****[*tert*-butyl 2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)acetate] (2-41)**

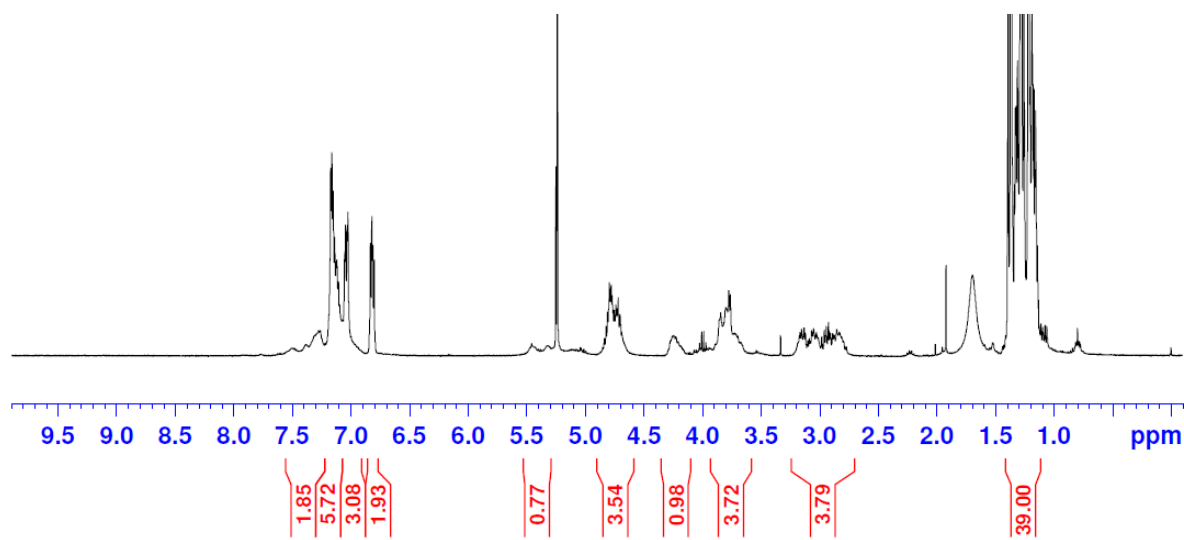
To a mixture of tetrapeptide **2-40** (1.00 g, 1.67 mmol), amine **2-10** (660 mg, 2.00 mmol) in THF (20 mL) were added NaHCO<sub>3</sub> (210 mg, 2.50 mmol) and DEPBT (750 mg, 2.50 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 48 h at room temperature. The mixture was quenched with H<sub>2</sub>O (20 mL) and extracted with EtOAc (20 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (40 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 1/2-0/1) to give **2-41** (996 mg, 66%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3298, 2978, 2930, 1633, 1506, 1386, 1366, 1318, 1236, 1158, 1098, 752 cm<sup>-1</sup>;

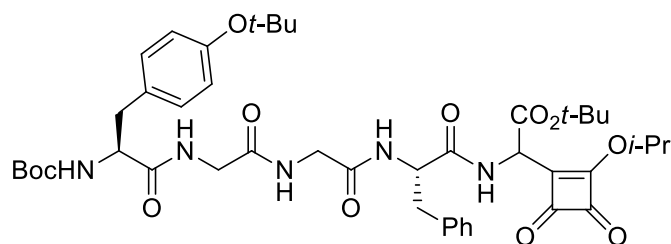
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) δ 173.5, 171.9, 171.9, 170.4, 169.8, 168.6, 168.1, 156.7, 155.0, 137.6, 132.9, 132.0, 130.3, 130.0, 130.0, 129.0, 127.3, 124.8, 124.7, 86.2, 85.7, 83.6, 83.4, 81.2, 81.1, 78.9, 78.3, 78.2, 74.5, 74.4, 58.0, 44.2, 43.9, 37.6, 29.1, 28.6, 28.3, 28.2, 28.2, 23.1, 22.9, 22.7;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>47</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>13</sub>+Na]<sup>+</sup> 932.4633, found 932.4635.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-41** in CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.



**Boc-L-Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-L-Phe-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-O*i*-Pr (2-42)**



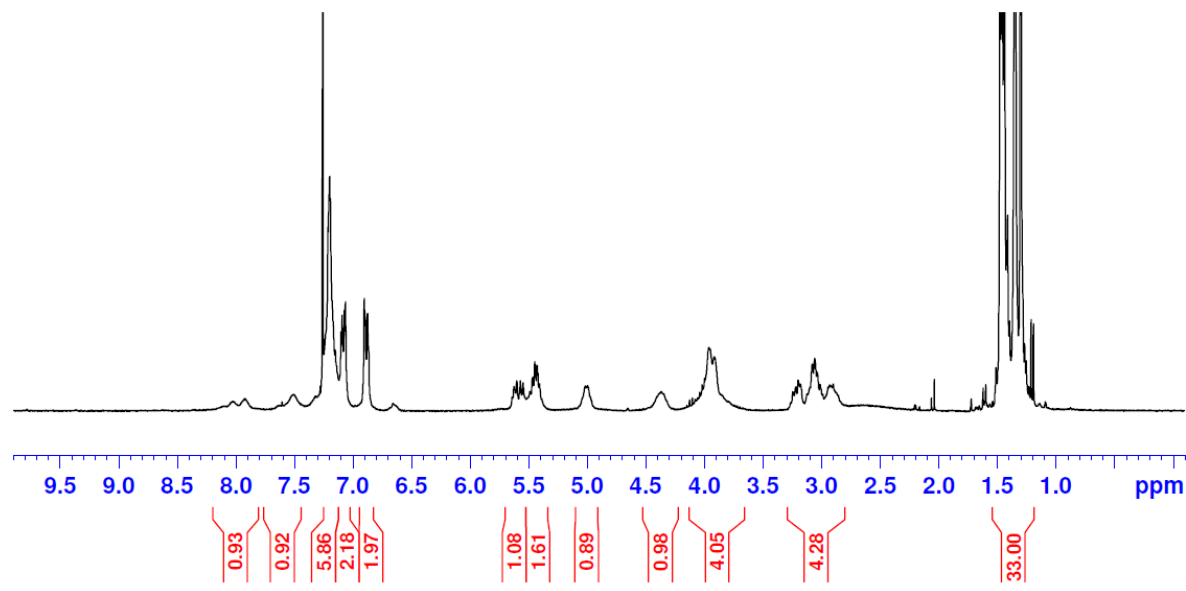
To a solution of **2-41** (960 mg, 1.05 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was added 12 *N* HCl (98.0  $\mu$ L, 1.10 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 1 h. The mixture was quenched with NaHCO<sub>3</sub>, and filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 1/1-0/1) to give **2-42** (480 mg, 54%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3289, 2979, 1798, 1744, 1701, 1631, 1596, 1506, 1390, 1367, 1235, 1157, 1094, 899, 754 cm<sup>-1</sup>;

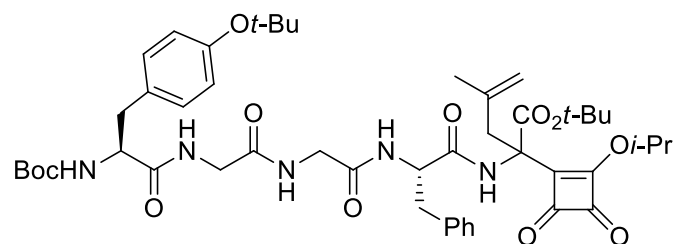
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.7, 196.6, 193.4, 192.1, 173.7, 172.5, 170.9, 169.1, 165.1, 164.7, 156.0, 154.3, 136.6, 136.5, 131.3, 129.7, 129.4, 128.4, 126.9, 126.8, 124.3, 124.2, 84.5, 84.4, 80.5, 80.4, 78.5, 78.4, 56.5, 54.3, 53.9, 50.1, 43.4, 43.2, 38.3, 37.7, 28.8, 28.3, 27.9, 22.8, 22.7;

HRMS (ESI) *m/z* (M-H)<sup>-</sup>calcd for [C<sub>44</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>-H]<sup>-</sup> 848.4082, found 848.4093.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-42** in CDCl<sub>3</sub>.



**Boc-L-Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-L-Phe-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl) $\Delta$ SqLeu]-*Oi*-Pr (2-43)**



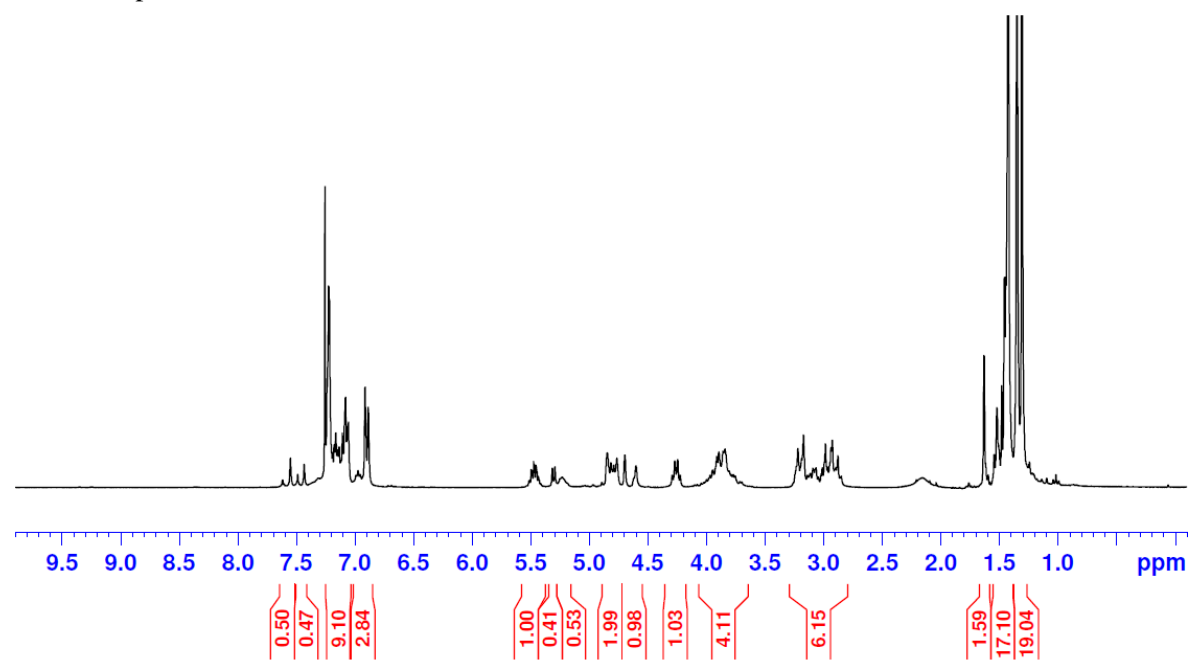
To a solution of **2-42** (450 mg, 0.529 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) were added 3-bromo-2-methylpropene (1.30 mL, 12.7 mmol) and TBAI (2.34 g, 6.35 mmol) at room temperature.  $\text{Et}_3\text{N}$  (88.0  $\mu\text{L}$ , 0.635 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred for 1 h, concentrated *in vacuo*. The residue was filtrated through a celite pad using EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 1/1-1/5) to give **2-43** (263 mg, 55%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3298, 2979, 1793, 1757, 1636, 1591, 1507, 1389, 1367, 1235, 1153, 1096, 1016, 900, 754  $\text{cm}^{-1}$ ;

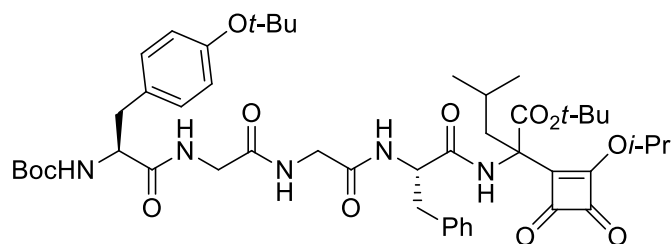
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195.9, 195.7, 195.6, 193.5, 193.1, 192.0, 191.8, 179.0, 172.6, 172.5, 172.4, 170.1, 169.6, 169.4, 169.1, 166.8, 154.4, 154.3, 139.1, 137.0, 136.9, 131.3, 129.6, 129.4, 128.5, 128.4, 126.8, 126.7, 124.3, 117.1, 116.8, 84.9, 84.5, 84.4, 80.7, 80.6, 80.5, 80.4, 80.3, 78.5, 62.7, 62.6, 62.3, 56.5, 54.2, 53.9, 43.2, 40.8, 40.3, 37.3, 36.7, 28.8, 27.8, 23.1, 23.0, 22.9, 22.8, 22.7;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{48}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  926.4527, found 926.4501.

$^1\text{H}$  NMR spectrum of **2-43** in  $\text{CDCl}_3$ .



**Boc-L-Tyr(*t*-Bu)-Gly-Gly-L-Phe-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqLeu]-*Oi*-Pr (2-44)**



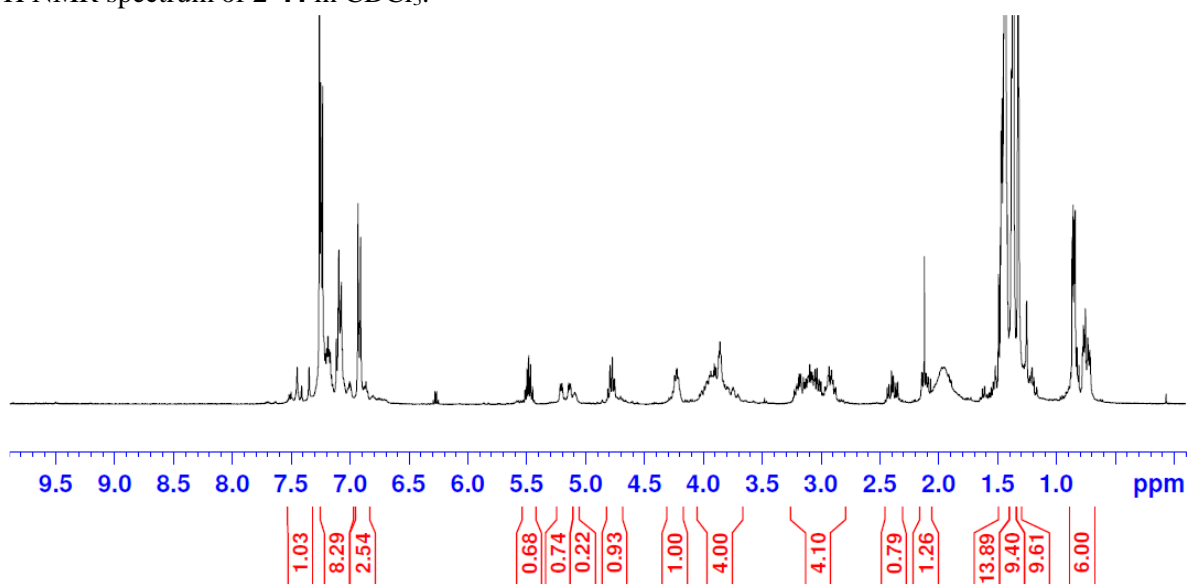
To a solution of **2-43** (25 mg, 0.0277 mmol) in MeOH (1 mL) was added Pearlman's catalyst (12 mg) at room temperature. The mixture was stirred under H<sub>2</sub> for 12 h at room temperature, and filtrated through a celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 1/1-1/5) to give **2-44** (10 mg, 40%, an inseparable mixture of diastereomers) as a white amorphous solid:

FTIR (neat) 3299, 2978, 1794, 1757, 1636, 1590, 1506, 1390, 1367, 1238, 1159, 1095, 1017, 901, 841, 754 cm<sup>-1</sup>;

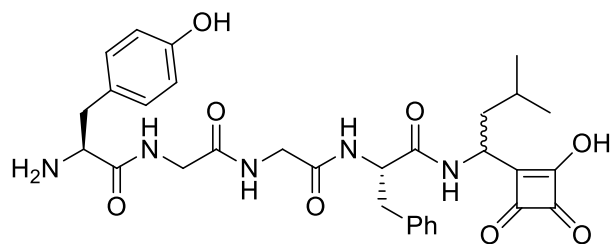
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.0, 195.7, 193.6, 193.1, 191.9, 179.7, 172.4, 169.9, 169.4, 169.2, 167.4, 156.2, 154.5, 154.4, 137.0, 136.9, 129.6, 129.6, 129.4, 128.5, 128.4, 126.8, 126.6, 124.4, 84.9, 84.4, 84.3, 80.8, 80.6, 80.4, 80.2, 78.5, 78.5, 63.0, 62.8, 56.7, 56.5, 54.4, 54.0, 43.3, 43.2, 41.0, 40.5, 37.1, 36.6, 28.8, 27.7, 24.5, 24.2, 24.1, 23.6, 23.5, 23.4, 23.0, 22.9, 22.8, 22.7;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>48</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 928.4684, found 928.4656.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-44** in CDCl<sub>3</sub>.



### [Sq-Leu<sup>5</sup>] Enkephalin (2-25)

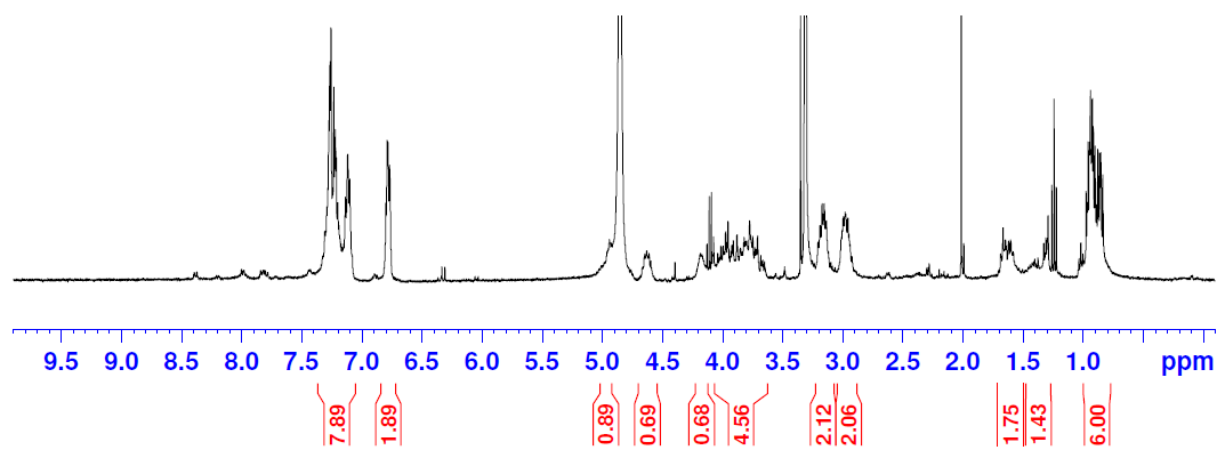


To a solution of **2-44** (8 mg, 0.0084 mmol) in Acetone (1 mL) was added 30% HBr/AcOH (1 mL) and the mixture was stirred at room temperature for 4 h, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> (H<sub>2</sub>O/MeOH (1% TFA) = 9/1-1/1) to give **2-25** (3 mg, 56%, a mixture of two diastereomers) as a yellow powder:

FTIR (neat) 3297, 2946, 1768, 1648, 1559, 1517, 1447, 1240, 1026 cm<sup>-1</sup>;

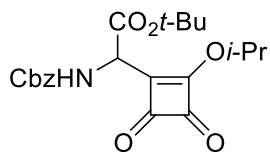
HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>+Na]<sup>+</sup> 630.2540, found 630.2507.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-25** in CD<sub>3</sub>OD.





### Cbz-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-Oi-Pr (2-51a)



To a solution of **2-50** (0.96 g, 2.07 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) was added 12 *N* HCl (0.18 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h. The mixture was quenched with NaHCO<sub>3</sub>, and filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-51a** (0.72 g, 86%) as a yellow oil:

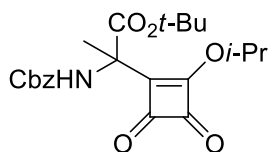
FTIR (neat) 3356, 2980, 2937, 1798, 1750, 1717, 1507, 1455, 1391, 1325, 1225, 1150, 1095, 1055, 1026 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.41-7.27 (m, 5H), 5.92 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.45 (sept, *J* = 5.6 Hz, 1H), 5.41 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.13 (s, 2H), 1.51-1.42 (m, 15H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.6, 193.7, 191.4, 174.8, 165.2, 155.6, 136.0, 128.6, 128.4, 128.2, 84.8, 80.5, 67.5, 51.6, 28.0, 22.8, 22.7;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>21</sub>H<sub>24</sub>NO<sub>7</sub>-H]<sup>-</sup> 402.1558, found 402.1555.

### Cbz-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqAla]-Oi-Pr (2-51b)



To a solution of **2-19a** (1.17 g, 2.45 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) was added 12 *N* HCl (0.2 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h. The mixture was quenched with NaHCO<sub>3</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-51b** (0.89 g, 87%) as a yellow oil:

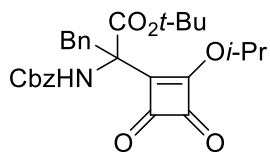
FTIR (neat) 3362, 2983, 2938, 1794, 1724, 1590, 1498, 1455, 1390, 1370, 1332, 1282, 1258, 1153, 1088, 1059, 1014 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.41-7.27 (m, 5H), 6.09 (s, 1H), 5.45 (sept, *J* = 6.2 Hz, 1H), 5.09 (s, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.42 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.38 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  195.5, 194.0, 191.3, 179.7, 168.1, 154.4, 136.1, 128.5, 128.2, 128.0, 84.5, 79.8, 74.6, 66.9, 58.9, 27.7, 22.7, 22.6, 21.6;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>7</sub>-H]<sup>-</sup> 416.1715, found 416.1711.

### Cbz-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqPhe]-O*i*-Pr (**2-51c**)



To a solution of **2-19c** (1.32 g, 2.39 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (24 mL) was added 12 *N* HCl (0.21 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h. The mixture was quenched with NaHCO<sub>3</sub>, and filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 20/1-3/1) to give **2-51c** (1.04 g, 88%) as a yellow oil:

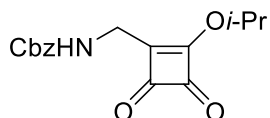
FTIR (neat) 3418, 3032, 2982, 2936, 1794, 1758, 1723, 1592, 1488, 1455, 1389, 1330, 1280, 1215, 1150, 1096, 1073, 1017 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.45-7.27 (m, 5H), 7.25-7.15 (m, 3H), 7.08-6.99 (m, 2H), 5.99 (s, 1H), 5.47 (sept, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.20 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 5.07 (d, *J* = 12.4 Hz, 1H), 3.82 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 3.61 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H), 1.43 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.38 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  195.7, 193.9, 191.1, 179.0, 166.3, 154.4, 136.3, 134.2, 130.2, 128.5, 128.3, 128.2, 128.1, 127.5, 85.0, 80.1, 66.8, 63.5, 38.0, 27.8, 22.7;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub>-H]<sup>-</sup> 492.2022, found 492.2020.

### Cbz-SqGly-O*i*-Pr (**2-52a**)



To a solution of **2-51a** (0.22 g, 0.54 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.4 mL) was added TFA (1.2 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. To the mixture was added toluene (20 mL) and the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-52a** (0.10 g, 61%) as an orange oil:

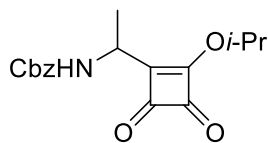
FTIR (neat) 3368, 2983, 2936, 1795, 1751, 1717, 1592, 1520, 1456, 1400, 1325, 1244, 1143, 1096, 1052 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.46-7.23 (m, 5H), 5.50 (m, 1H), 5.37 (sept, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.12 (s, 2H), 4.38 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 1.41 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  197.0, 193.4, 193.2, 177.9, 156.4, 136.2, 128.7, 128.4, 128.3, 80.2, 67.4, 36.8, 22.9;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup> 302.1034, found 302.1030.

### Cbz-SqAla-Oi-Pr (2-52b)



To a solution of **2-51b** (0.89 g, 2.13 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (21 mL) was added TFA (4.9 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. The mixture was quenched with sat.NaHCO<sub>3</sub> and the organic layer was separated. The aqueous layer was extracted with EtOAc (20 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-52b** (0.53 g, 78%) as an orange oil:

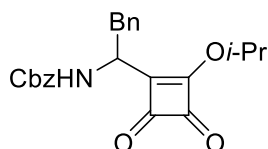
FTIR (neat) 3328, 3034, 2986, 2935, 1792, 1752, 1715, 1588, 1521, 1455, 1393, 1326, 1241, 1144, 1093, 1064, 1004 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41-7.25 (m, 5H), 5.45 (m, 1H), 5.38 (sept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.90 (m, 1H), 1.47 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.48-1.38 (m, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196.1, 193.5, 181.9, 155.6, 136.2, 128.8, 128.7, 128.3, 128.2, 80.1, 67.1, 44.6, 22.82, 22.80, 18.5;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup> 316.1190, found 316.1184.

### Cbz-SqPhe-Oi-Pr (2-52c)



To a solution of **2-51c** (0.76 g, 1.54 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) was added TFA (3.6 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. The mixture was quenched with sat.NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) and separated the organic layer. The aqueous layer was extracted with EtOAc (15 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-52c** (0.56 g, 92%) as an orange oil:

FTIR (neat) 3331, 3036, 2983, 2935, 1792, 1752, 1718, 1591, 1518, 1455, 1398, 1328, 1244, 1096, 1013 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.40-7.22 (m, 8H), 7.12 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 5.48 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 5.19 (sept, *J* = 6.2 Hz, 1H), 5.15- 5.05 (m, 3H), 3.18 (dd, *J* = 13.5 Hz, 6.1 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 13.5, 7.6 Hz, 1H), 1.27 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.23 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H);

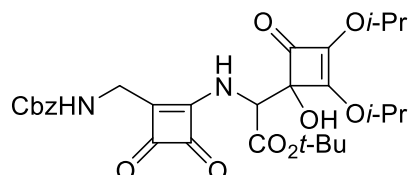
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196.6, 193.4, 193.1, 179.9, 155.7, 136.2, 135.6, 129.3, 128.9, 128.7,

128.4, 128.2, 127.4, 80.0, 67.2, 50.1, 39.0, 22.6;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>calcd for [C<sub>23</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup> 392.1503, found 392.1498.

### Cbz-SqGly-[*tert*-butyl

### 2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)acetate] (2-53a)



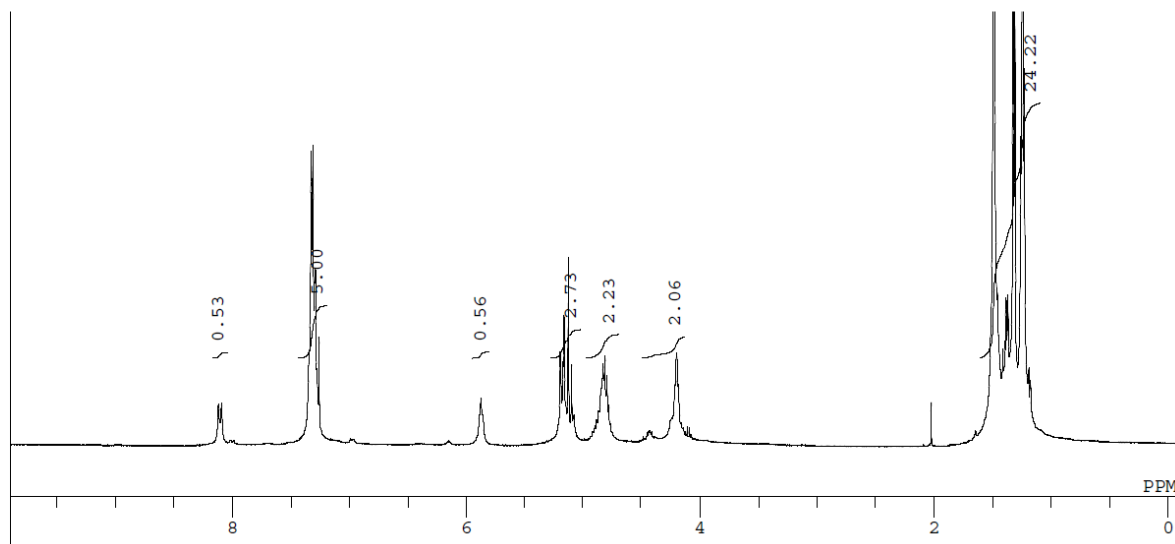
To a solution of **2-10** (0.239 g, 0.726 mmol) in MeOH (3 mL) was added **2-52a** (0.20 g, 0.66 mmol) in MeOH (7 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h and quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl (10 mL), and removed MeOH solvent in *vacuo*. The aqueous solution was extracted with EtOAc (5 mL x 3) and washed with 1N HCl (10 mL), sat. NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/2) to give **2-53a** (0.32 g, 84%, an inseparable mixture of diastereomers) as yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3334, 2979, 2935, 1788, 1740, 1697, 1604, 1522, 1388, 1319, 1252, 1157, 1097 cm<sup>-1</sup>;

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.0, 190.7, 184.0, 181.0, 166.9, 163.9, 158.4, 136.1, 133.0, 128.6, 128.4, 128.3, 86.0, 84.3, 78.0, 74.2, 67.8, 60.4, 34.2, 27.9, 22.8, 22.7, 22.5, 22.3;

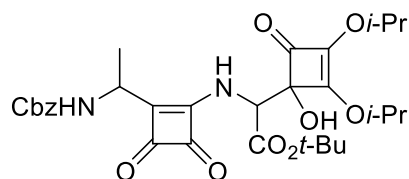
HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>calcd for [C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>-H]<sup>-</sup> 571.2297, found 571.2285.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-53a** in CDCl<sub>3</sub>.



### Cbz-SqAla-[*tert*-butyl

### 2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)acetate] (**2-53b**)



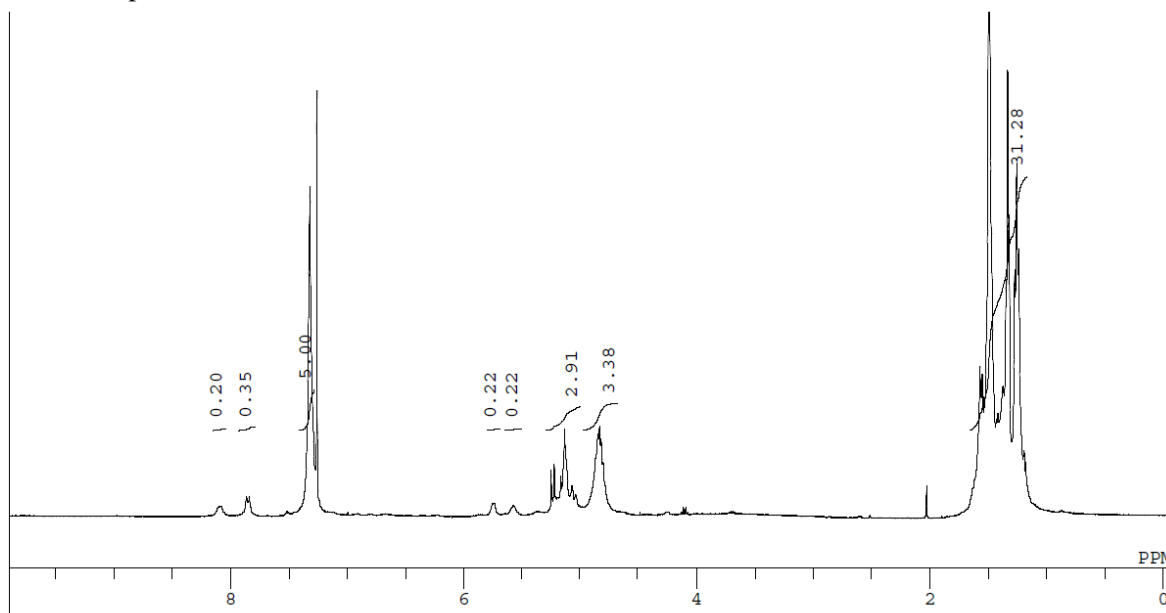
To a solution of **2-10** (0.072 g, 0.220 mmol) in MeOH (3 mL) was added **2-52b** (0.063 g, 0.200 mmol) in MeOH (2 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h and quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl (5 mL), and removed MeOH solvent in *vacuo*. The aqueous solution was extracted with EtOAc (5 mL x 3) and washed with 1N HCl (5 mL), sat. NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-53b** (0.116 g, 81%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3327, 2981, 2938, 1787, 1739, 1698, 1601, 1522, 1456, 1387, 1374, 1319, 1251, 1156, 1096 cm<sup>-1</sup>;

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.4, 189.8, 182.5, 180.9, 170.3, 166.9, 156.8, 135.8, 132.9, 132.7, 128.5, 128.4, 128.2, 128.1, 85.8, 84.1, 77.9, 74.1, 74.0, 67.5, 60.5, 43.7, 43.5, 27.8, 22.7, 22.7, 22.6, 22.4, 22.2, 22.2, 17.8, 17.4;

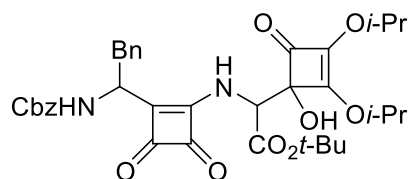
HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>-H]<sup>-</sup> 585.2454, found 585.2454.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-53b** in CDCl<sub>3</sub>.



### Cbz-SqPhe-[*tert*-butyl]

### 2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)acetate] (2-53c)



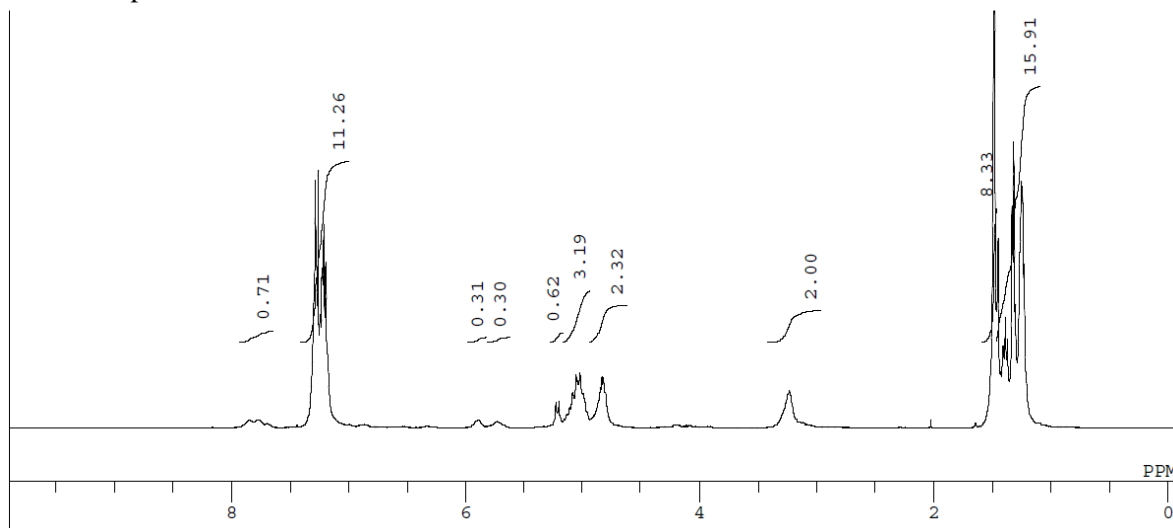
To a solution of **2-10** (0.023 g, 0.070 mmol) in MeOH (3 mL) was added **2-52c** (0.025 g, 0.0636 mmol) in MeOH (1 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h and quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl (10 mL), and removed MeOH solvent in *vacuo*. The aqueous solution was extracted with EtOAc (5 mL x 3) and washed with 1N HCl (5 mL), sat. NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated in *vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-53c** (0.036 g, 85%, an inseparable mixture of diastereomers) as yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3338, 2981, 2935, 1785, 1739, 1697, 1596, 1520, 1455, 1387, 1373, 1318, 1249, 1154, 1095, 1027 cm<sup>-1</sup>;

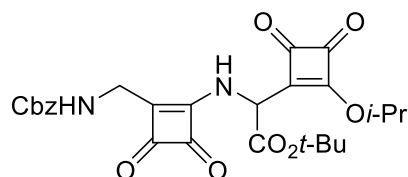
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.1, 190.4, 190.0, 182.8, 181.2, 181.0, 169.5, 169.2, 166.9, 166.8, 164.1, 156.9, 156.9, 136.5, 136.3, 136.0, 132.9, 132.8, 129.3, 129.2, 128.8, 128.7, 128.5, 128.2, 128.1, 127.1, 127.1, 127.0, 85.9, 85.8, 84.2, 84.1, 78.0, 74.4, 74.2, 74.1, 67.4, 60.6, 60.5, 49.3, 49.2, 37.5, 27.9, 27.8, 22.9, 22.8, 22.7, 22.5, 22.3;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>36</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>O<sub>10</sub>-H]<sup>-</sup> 661.2767, found 661.2764.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-53c** in CDCl<sub>3</sub>.



### Cbz-SqGly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-*Oi*-Pr (**2-54a**)



To a solution of **2-53a** (0.24 g, 0.41 mmol) in (CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub> (4 mL) was added Sc(OTf)<sub>3</sub> (0.020 g, 0.041 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 40 °C and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/2) to give **2-54a** (0.18 g, 83%) as a yellow amorphous solid:

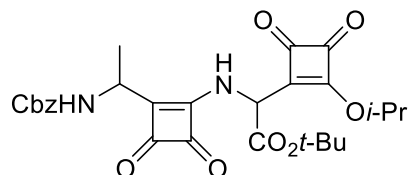
FTIR (neat) 3329, 2983, 2936, 1790, 1745, 1698, 1595, 1519, 1455, 1392, 1372, 1345, 1329, 1295, 1254, 1150, 1092 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.41-7.26 (m, 5H), 5.90 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.44 (sept, *J* = 6.1 Hz, 1H), 5.36 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H), 5.24-5.16 (m, 2H), 4.23 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 1.53 (s, 9H), 1.45 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 1.44 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.2, 193.0, 192.8, 190.2, 189.9, 183.9, 172.6, 167.8, 164.0, 158.3, 135.8, 128.4, 128.2, 128.1, 85.4, 81.0, 67.6, 53.4, 33.7, 27.7, 22.6, 22.5;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>26</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>-H]<sup>-</sup> 511.1722, found 511.1708.

### Cbz-SqAla-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-*Oi*-Pr (**2-54b**)



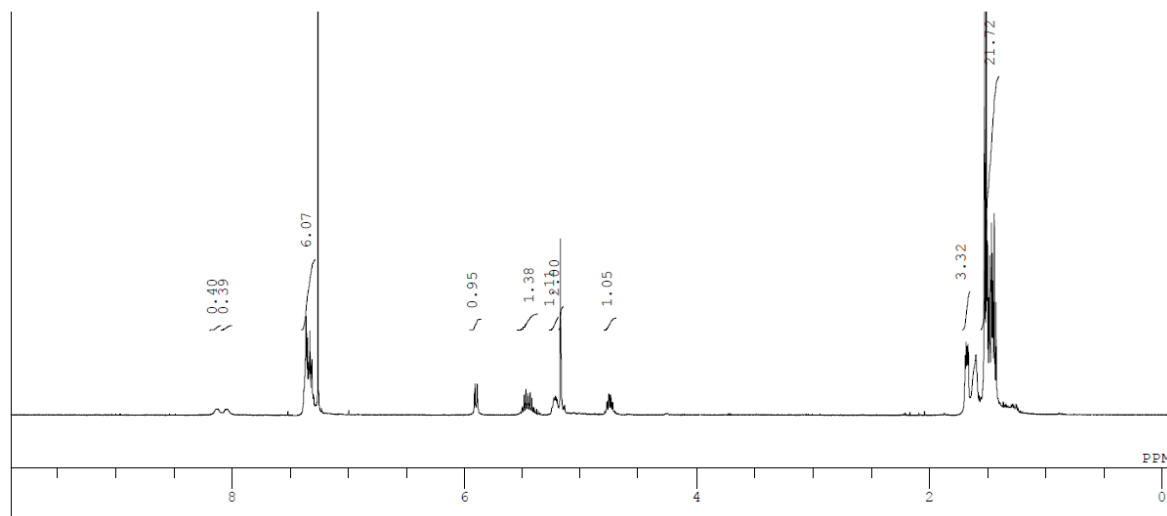
To a solution of **2-53b** (65 mg, 0.11 mmol) in (CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub> (1 mL) was added Sc(OTf)<sub>3</sub> (5.0 mg, 0.01 mmol). The mixture was stirred for 40 min at 40 °C and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/1) to give **2-54b** (50 mg, 86%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3327, 2983, 2937, 1790, 1744, 1595, 1520, 1455, 1391, 1372, 1328, 1248, 1151, 1092, 1066, 1028 cm<sup>-1</sup>;

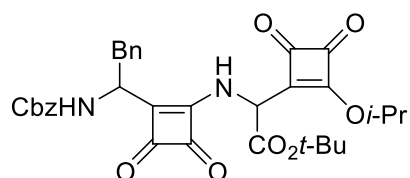
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.2, 196.1, 193.0, 190.3, 189.4, 189.3, 182.7, 182.6, 172.6, 172.5, 171.2, 164.0, 163.9, 157.0, 135.8, 135.8, 128.3, 128.1, 85.3, 80.9, 80.8, 67.3, 53.4, 53.3, 43.4, 27.6, 22.6, 22.5, 22.4, 17.9;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>-H]<sup>-</sup> 525.1879, found 525.1869.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-54b** in CDCl<sub>3</sub>.



**Cbz-SqPhe-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-O*i*-Pr (**2-54c**)**



To a solution of **2-53c** (0.48 g, 0.719 mmol) in (CH<sub>2</sub>Cl)<sub>2</sub> (7 mL) was added Sc(OTf)<sub>3</sub> (0.035 mg, 0.072 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 40 °C and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/1) to give **2-54c** (0.34 g, 77%, an inseparable mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

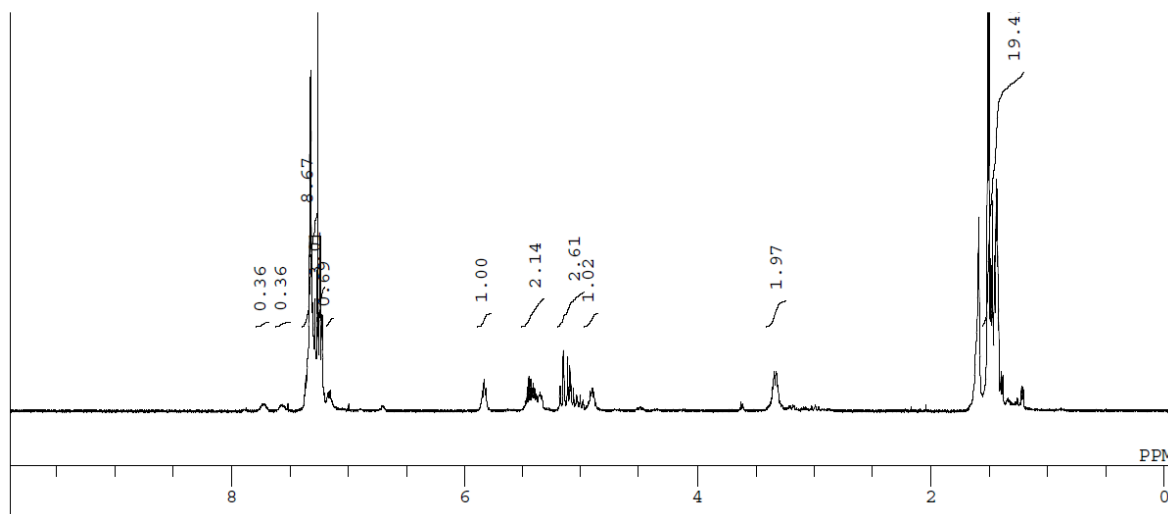
FTIR (neat) 3320, 3063, 3031, 2984, 2936, 1788, 1744, 1699, 1592, 1519, 1497, 1455, 1391, 1371, 1329, 1252, 1150, 1092, 1027 cm<sup>-1</sup>;

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.1, 193.0, 192.9, 192.6, 192.5, 190.2, 189.6, 182.7, 172.4, 170.0, 163.9, 163.8, 156.8, 155.4, 136.2, 135.8, 128.9, 128.5, 128.3, 128.0, 127.9, 126.8, 85.3, 80.9, 67.1, 53.4, 53.1, 49.1, 49.0, 36.9, 27.6, 22.5, 22.5, 22.4;

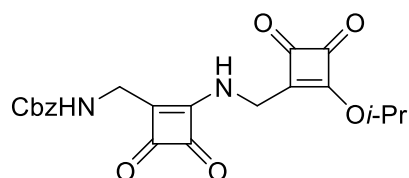
HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>33</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>-H]<sup>-</sup> 601.2192, found 601.2184.



$^1\text{H}$  NMR spectrum of **2-54c** in  $\text{CDCl}_3$ .



### Cbz-SqGly-SqGly-Oi-Pr (**2-55a**)



To a solution of **2-54a** (32 mg, 0.063 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.6 mL) was added TFA (1.5 mL) at  $0^\circ\text{C}$ . The mixture was stirred for 10 min at  $0^\circ\text{C}$ , warmed to room temperature, and stirred for 12 h. To the mixture was added toluene (10 mL) and the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-1/3) to give **2-55a** (20 mg, 77%) as an orange amorphous solid:

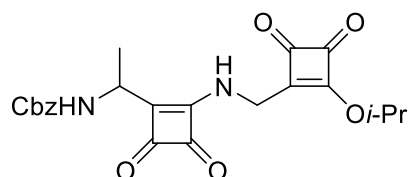
FTIR (neat) 3306, 3064, 3033, 2985, 2934, 1788, 1742, 1702, 1589, 1520, 1454, 1401, 1320, 1250, 1143, 1093, 1043  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.81 (t,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 7.52-7.23 (m, 5H), 5.86 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H), 5.35 (sept,  $J = 6.1$  Hz, 1H), 5.11 (s, 2H), 4.77 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 4.15 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H), 1.41 (d,  $J = 6.1$  Hz, 6H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.8, 193.1, 192.7, 192.1, 189.9, 184.7, 175.5, 166.8, 158.6, 135.8, 128.6, 128.4, 128.2, 80.7, 67.7, 39.3, 33.6, 22.7;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H) $^-$  calcd for  $[\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_7\text{-H}]^-$  411.1198, found 411.1192.

### Cbz-SqAla-SqGly-Oi-Pr (**2-55b**)



To a solution of **2-54b** (74 mg, 0.141 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.4 mL) was added TFA (0.33 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. To the mixture was added toluene (20 mL) and the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/2) to give **2-55b** (37 mg, 62%) as a yellow amorphous solid:

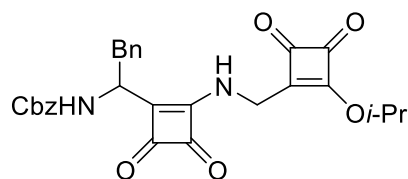
FTIR (neat) 3307, 2984, 2935, 1788, 1740, 1710, 1590, 1522, 1454, 1400, 1300, 1244, 1145, 1093, 1065, 1029 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.67 (br s, 1H), 7.40-7.26 (m, 5H), 5.44 (br s, 1H), 5.37 (sept, *J* = 6.2 Hz, 1H), 5.10 (s, 2H), 4.81 (dd, *J* = 18.4, 6.1 Hz, 1H), 4.74 (dd, *J* = 18.4, 6.1 Hz, 1H), 4.38 (quin, *J* = 7.3 Hz, 1H), 1.66 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H), 1.42 (m, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196.7, 193.4, 192.7, 192.2, 189.4, 183.5, 175.6, 170.3, 157.2, 135.8, 128.5, 128.3, 128.1, 80.6, 67.4, 43.3, 39.4, 22.7, 22.6, 17.0;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>17</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup> 425.1354, found 425.1340.

#### Cbz-SqPhe-SqGly-Oi-Pr (2-55c)



To a solution of **2-54c** (135 mg, 0.224 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2.2 mL) was added TFA (0.52 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. To the mixture was added toluene (20 mL) and the mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/1) to give **2-55c** (87 mg, 78%) as a pale orange amorphous solid:

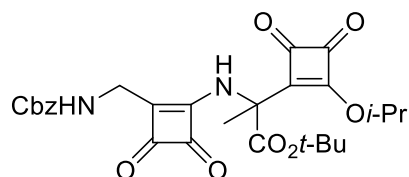
FTIR (neat) 3300, 3064, 3030, 2984, 2933, 1786, 1741, 1703, 1587, 1519, 1497, 1454, 1399, 1320, 1246, 1217, 1143, 1092, 1029 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.41-7.12 (m, 5H), 5.75 (br s, 1H), 5.35 (sept, *J* = 6.1 Hz, 1H), 5.12-4.98 (m, 2H), 4.83 (br q, *J* = 7.3 Hz, 1H), 4.75 (dd, *J* = 18.0, 5.8 Hz, 1H), 4.66 (dd, *J* = 18.0, 5.8 Hz, 1H), 3.29 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 1.40 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 1.39 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196.8, 192.8, 192.7, 192.2, 189.7, 183.5, 175.3, 169.1, 157.1, 136.3, 135.8, 129.1, 128.7, 128.5, 128.3, 127.9, 127.1, 80.7, 67.3, 49.2, 39.2, 37.1, 22.62, 22.60;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>26</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>-H]<sup>-</sup> 501.1667, found 501.1664.

### Cbz-SqGly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqAla]-O*i*-Pr (2-57a)



To a solution of **2-54a** (53 mg, 0.103 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (1 mL) were added MeI (0.65 mL, 10.3 mmol), TBAI (190 mg, 0.515 mmol), and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21 mg, 0.155 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 10 h at room temperature, filtrated through a celite pad, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-57a** (40 mg, 73%) as a yellow amorphous solid:

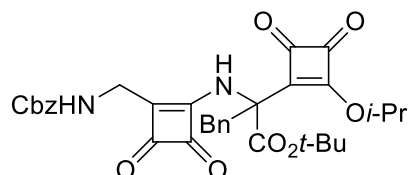
FTIR (neat) 3330, 2983, 2934, 1789, 1746, 1698, 1596, 1521, 1457, 1424, 1391, 1371, 1328, 1259, 1148, 1090, 1051, 1017 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.39 (s, 1H), 7.39-7.23 (m, 5H), 5.46 (m, 1H), 5.37 (sept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 5.17 (s, 2H), 4.23 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H), 1.89 (s, 2H), 1.57 (s, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.34 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H), 1.33 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  194.7, 193.3, 190.0, 189.7, 185.9, 178.3, 167.3, 166.6, 158.5, 135.9, 128.6, 128.4, 128.2, 85.6, 80.6, 67.8, 61.5, 33.2, 28.2, 27.7, 24.0, 22.7, 22.6;

HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>-H]<sup>-</sup> 525.1879, found 525.1862.

### Cbz-SqGly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqPhe]-O*i*-Pr (2-57b)



To a solution of **2-54a** (33 mg, 0.064 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (0.64 mL) were added BnBr (0.038 mL, 0.32 mmol), TBAI (120 mg, 0.32 mmol), and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (27 mg, 0.19 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 4 h at room temperature, filtrated through a celite pad, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-57b** (32 mg, 85%) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3325, 2986, 2935, 1791, 1746, 1698, 1595, 1517, 1456, 1422, 1390, 1331, 1259, 1149, 1092, 1003 cm<sup>-1</sup>;

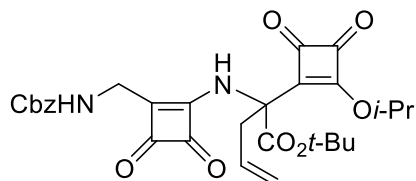
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.42 (s, 1H), 7.40-7.17 (m, 8H), 7.08 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.48 (br t, 1H), 5.41 (sept, *J* = 6.3 Hz, 1H), 5.04 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.84 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H), 4.20 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.81 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H), 3.62 (d, *J* = 14.4 Hz, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.35 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H), 1.31 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  195.2, 193.1, 192.3, 189.9, 189.7, 185.7, 177.9, 167.5, 165.6, 158.1, 135.7, 132.9, 130.2, 128.6, 128.5, 128.3, 128.2, 127.9, 86.1, 80.8, 67.6, 66.0, 41.8, 33.1, 27.1, 22.7,

22.6;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>calcd for [C<sub>33</sub>H<sub>34</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>-H]<sup>-</sup> 601.2192, found 601.2173.

**Cbz-SqGly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqAllylglycine]-Oi-Pr (2-57c)**



To a solution of **2-54a** (26 mg, 0.051 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (1 mL) were added allyl bromide (0.022 mL, 0.255 mmol), TBAI (94 mg, 0.255 mmol), and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21 mg, 0.154 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 4 h at room temperature, filtrated through a celite pad, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-57c** (18 mg, 64%) as a pale yellow amorphous solid:

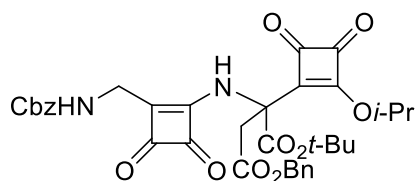
FTIR (neat) 3345, 2982, 1792, 1744, 1697, 1594, 1521, 1419, 1390, 1330, 1251, 1151, 1094, 1003, 758 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.32 (s, 1H), 7.35-7.26 (m, 5H), 5.68-5.49 (m, 2H), 5.38 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 5.26-5.16 (m, 2H), 5.16 (s, 2H), 4.22 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 2H), 3.11 (dd,  $J$  = 14.7, 7.2 Hz, 1H), 3.04 (dd,  $J$  = 14.7, 7.2 Hz, 1H), 1.50 (s, 9H), 1.34 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H), 1.32 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  194.9, 193.2, 192.2, 189.9, 189.8, 186.1, 177.7, 166.7, 166.0, 158.4, 135.9, 128.8, 128.6, 128.4, 128.1, 122.2, 85.7, 80.7, 67.7, 64.7, 40.5, 33.2, 27.8, 22.7, 22.6;

HRMS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>calcd for [C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>9</sub>-H]<sup>-</sup> 551.2035, found 551.2031.

**Cbz-SqGly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqAsp(OBn)]-Oi-Pr (2-57d)**



To a solution of **2-54a** (26 mg, 0.051 mmol) in CH<sub>3</sub>CN (1 mL) were added benzyl bromoacetate (0.040 mL, 0.255 mmol), TBAI (94 mg, 0.255 mmol), and K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (21 mg, 0.154 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 4 h at room temperature, filtrated through a celite pad, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **2-57d** (22 mg, 65%) as a pale yellow amorphous solid:

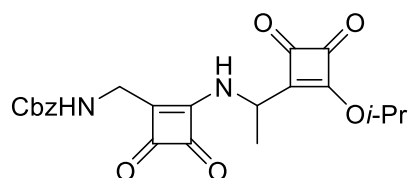
FTIR (neat) 3345, 2982, 1792, 1748, 1700, 1594, 1521, 1418, 1389, 1346, 1257, 1192, 1148, 1095, 1003, 757, 701 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.69 (s, 1H), 7.38-7.19 (m, 10H), 5.37 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 5.25-5.10 (m, 3H), 5.08 (s, 2H), 4.20 (dd,  $J$  = 16.2, 6.3 Hz, 1H), 4.12 (dd,  $J$  = 16.2, 6.3 Hz, 1H), 3.71 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H), 3.53 (d,  $J$  = 16.8 Hz, 1H), 1.46 (s, 9H), 1.34 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H), 1.31 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195.3, 192.6, 192.1, 189.3, 189.2, 184.7, 175.5, 168.3, 168.1, 164.6, 158.2, 135.8, 135.2, 128.6, 128.5, 128.4, 128.35, 128.32, 86.1, 81.2, 67.9, 67.0, 62.5, 40.3, 33.5, 27.5, 22.7, 22.5;

HRMS (DART)  $m/z$  (M+H) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_{11}+\text{H}]^+$  661.2397, found 661.2382.

### Cbz-SqGly-SqAla-Oi-Pr (2-58a)



To a solution of **2-57a** (113 mg, 0.215 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2.1 mL) was added TFA (0.50 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. To the mixture was added toluene (1 mL) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/1) to give **2-58a** (70 mg, 77%) as an orange amorphous solid:

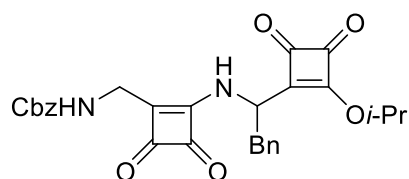
FTIR (neat) 3317, 2984, 2938, 1793, 1751, 1593, 1523, 1397, 1253, 1142, 1094, 1056, 1002  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.80 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 7.37-7.27 (m, 5H), 5.50 (br t, 1H), 5.42-5.30 (m, 2H), 5.14 (s, 2H), 4.16 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 2H), 1.57 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 1.40 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H), 1.39 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.0, 193.2, 192.9, 191.7, 189.4, 184.2, 179.4, 166.2, 158.7, 135.7, 128.6, 128.5, 128.3, 80.5, 67.9, 47.5, 33.3, 22.8, 22.7, 18.8;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H) $^-$  calcd for  $[\text{C}_{22}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_7-\text{H}]^-$  425.1354, found 425.1345.

### Cbz-SqGly-SqPhe-Oi-Pr (2-58b)



To a solution of **2-57b** (32 mg, 0.053 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (0.53 mL) was added TFA (0.12 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. To the mixture was added toluene (2 mL) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/1) to give **2-58b** (17 mg, 64%) as an orange amorphous solid:

FTIR (neat) 3313, 3068, 3036, 2983, 2930, 1789, 1744, 1699, 1590, 1518, 1455, 1392, 1344, 1326, 1249, 1092  $\text{cm}^{-1}$ ;

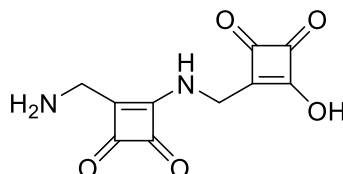
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.97 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 7.38-7.12 (m, 10H), 5.59 (ddd,  $J$  = 8.4, 8.2, 6.4 Hz, 1H), 5.37 (br t, 1H), 5.27 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 4.12 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 3.25

(dd,  $J = 13.6, 6.4$  Hz, 1H), 3.11 (dd,  $J = 13.6, 8.2$  Hz, 1H), 1.35 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 1.31 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.3, 192.9, 192.8, 192.0, 189.6, 184.0, 177.6, 166.5, 158.5, 135.7, 134.6, 129.4, 128.8, 128.6, 128.5, 128.3, 127.6, 80.6, 67.8, 52.9, 39.6, 33.4, 22.6, 22.5;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>calcd for  $[\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_7\text{-H}]^-$  501.1667, found 501.1661.

### SqGly-SqGly (2-56a)



A solution of **2-55a** (100 mg, 0.423 mmol) in 30% HBr/AcOH (3 mL) was stirred at room temperature for 2 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> ( $\text{H}_2\text{O}$ ) and reverse-phase HPLC ( $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1% TFA) to give **2-56a** (32 mg, 54%) as a pale yellow powder.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra show a mixture of two rotamers:

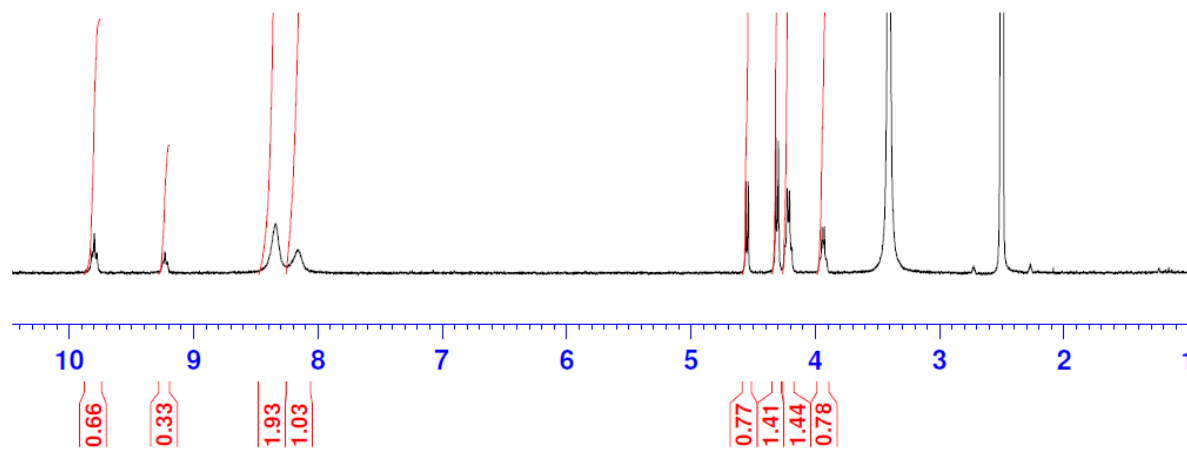
FTIR ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 3567, 1785, 1747, 1715, 1608, 1569, 1331, 1269, 1165  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  211.7, 211.3, 201.8, 201.7, 193.4, 192.8, 192.7, 192.5, 183.9, 183.1, 179.2, 177.6, 158.7, 157.8, 40.0, 39.2, 35.6, 34.2;

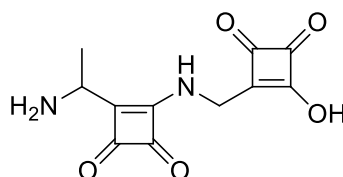
HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>calcd for  $[\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_5\text{-H}]^-$  235.0360, found 235.0356.

COSY and NOESY spectra of **2-56a** were shown in appendix.

$^1\text{H}$  NMR spectrum of **2-56a** in  $\text{DMSO-}d_6$ .



### SqAla-SqGly (2-56b)



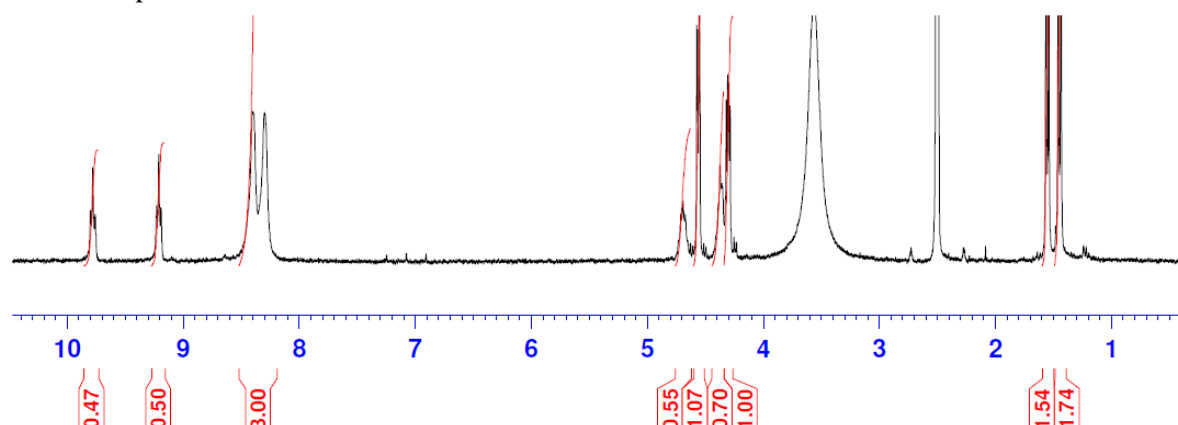
A solution of **2-55b** (14 mg, 0.033 mmol) in 30% HBr / AcOH (0.5 mL) was stirred at room temperature for 2 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> (H<sub>2</sub>O) to give **2-56b** (6.0 mg, 73%) as a pale yellow powder. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra show a mixture of two rotamers:

FTIR (H<sub>2</sub>O) 3485, 1785, 1715, 1609, 1569, 1332 cm<sup>-1</sup>;

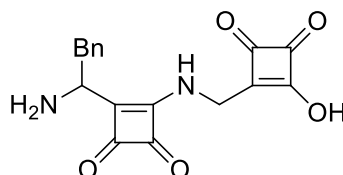
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 211.8, 211.4, 201.6, 201.5, 193.3, 193.2, 192.2, 191.6, 182.8, 182.0, 179.3, 177.5, 162.6, 161.4, 45.0, 44.3, 40.0, 39.2, 18.2, 16.5;

HRMS (DART) *m/z* (M+H)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>+H]<sup>+</sup> 251.0668, found 251.0697.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-56b** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.



### SqPhe-SqGly (**2-56c**)



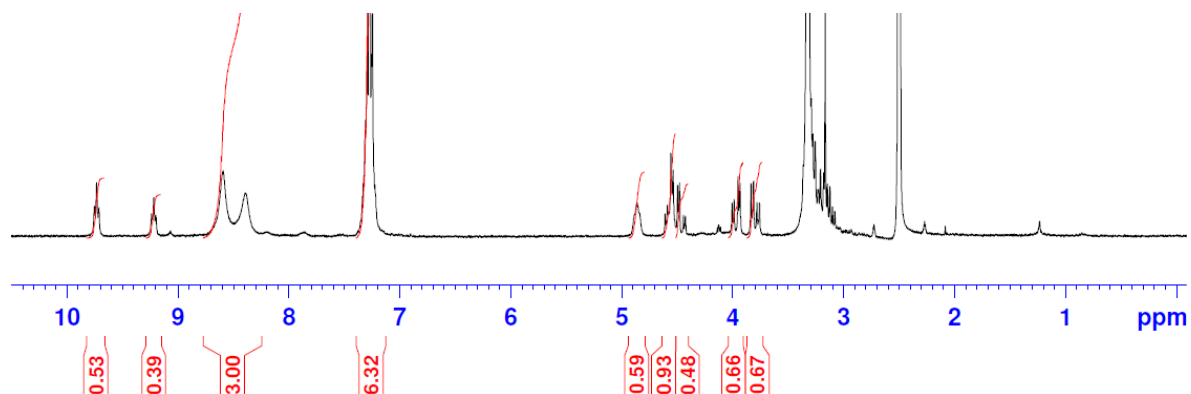
A solution of **2-55c** (37 mg, 0.074 mmol) in 30% HBr / AcOH (2.5 mL) was stirred at room temperature for 2 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> (H<sub>2</sub>O/MeOH = 10/1-3/1) to give **2-56c** (12 mg, 50%) as a pale yellow powder. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra show a mixture of two rotamers:

FTIR (H<sub>2</sub>O) 3448, 1786, 1747, 1716, 1608, 1571, 1331 cm<sup>-1</sup>;

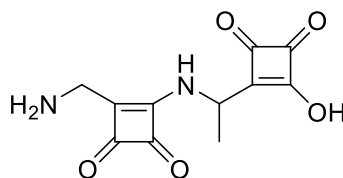
<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O/CD<sub>3</sub>OD 1:1) δ 212.1, 201.4, 193.1, 193.0, 192.4, 191.6, 183.6, 182.9, 178.4, 176.9, 161.1, 159.8, 135.6, 135.3, 130.22, 130.17, 130.13, 130.07, 129.1, 128.9, 50.4, 39.5, 38.4, 37.6;

HRMS (ESI) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup> 325.0830, found 325.0835.

$^1\text{H}$  NMR spectrum of **2-56c** in  $\text{DMSO-}d_6$ .



### SqGly-SqAla (**2-59a**)



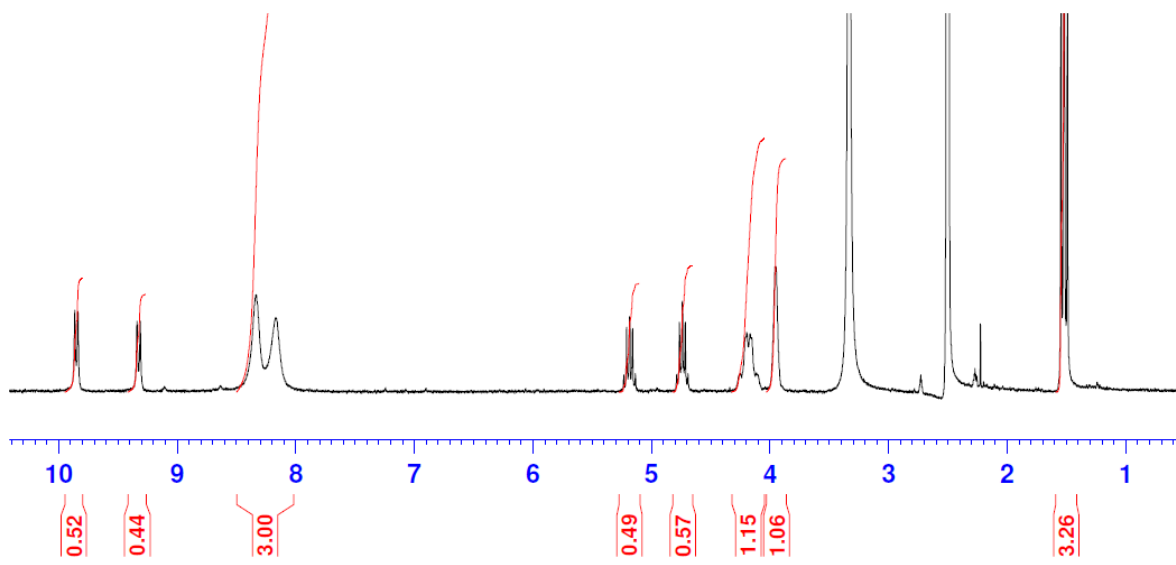
A solution of **2-58a** (32 mg, 0.075 mmol) in 30%  $\text{HBr}$  /  $\text{AcOH}$  (2.5 mL) was stirred at room temperature for 2 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> ( $\text{H}_2\text{O}$ ) to give **2-59a** (14 mg, 76%) as a pale yellow powder.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra show a mixture of two rotamers:

FTIR ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 3414, 1792, 1782, 1604, 1284  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  211.8, 211.5, 201.1, 201.0, 193.2, 192.7, 192.3, 183.3, 183.2, 181.8, 158.5, 157.6, 49.1, 48.7, 36.0, 34.2, 18.9, 18.2;

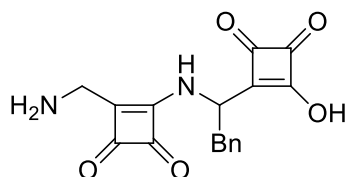
HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup> calcd for  $[\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5\text{-H}]^-$  249.0517, found 249.0506.

$^1\text{H}$  NMR spectrum of **2-59a** in  $\text{DMSO-}d_6$ .





### SqGly-SqPhe (2-59b)



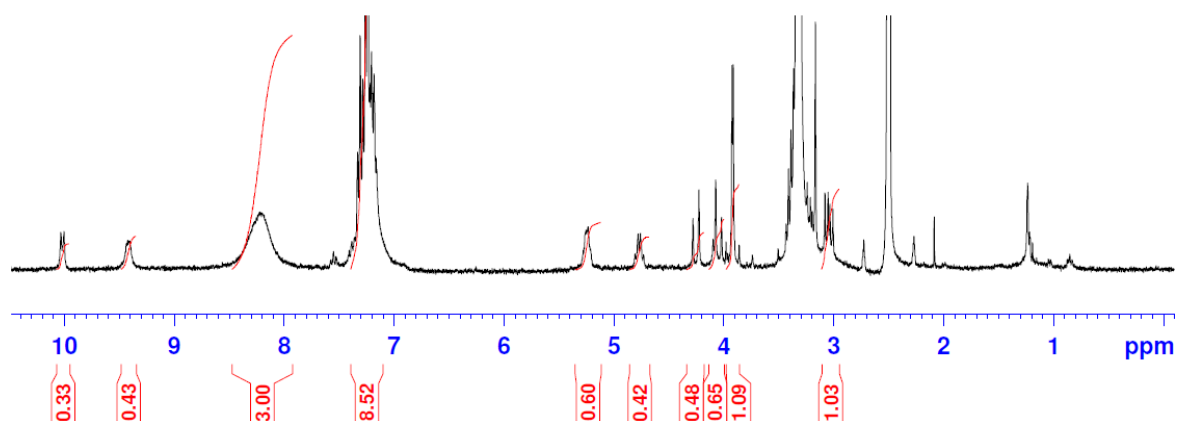
A solution of **2-58b** (19 mg, 0.038 mmol) in 30% HBr / AcOH (1.3 mL) was stirred at room temperature for 2 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> (H<sub>2</sub>O/MeOH = 10/1-3/1) to give **2-59b** (8.0 mg, 65%) as an orange oil. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra show a mixture of two rotamers:

FTIR (H<sub>2</sub>O) 3488, 1792, 1782, 1576 cm<sup>-1</sup>;

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, D<sub>2</sub>O/CD<sub>3</sub>OD 1:1) δ 212.1, 201.0, 200.9, 192.7, 191.9, 183.5, 180.6, 179.4, 158.3, 157.2, 137.5, 137.2, 130.5, 130.3, 129.8, 129.6, 128.4, 128.2, 55.0, 54.8, 39.7, 38.8, 35.7, 34.1;

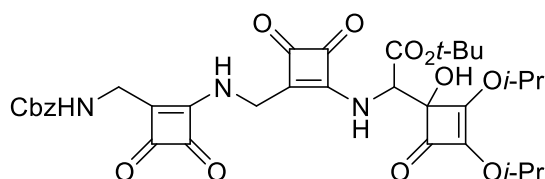
HRMS (FAB) *m/z* (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-H]<sup>-</sup> 325.0830, found 325.0825.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-59b** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.



### Cbz-SqGly-SqGly-[*tert*-butyl

### 2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)acetate] (2-60)

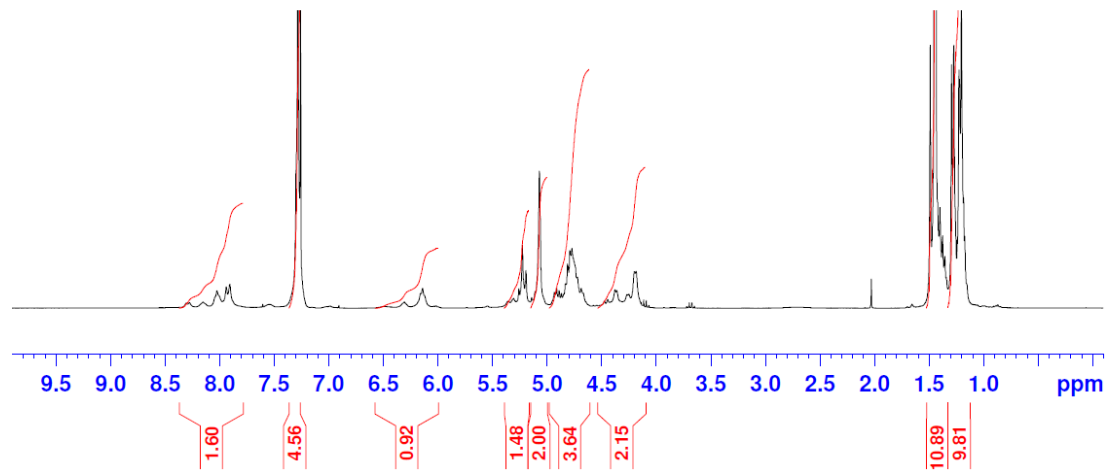


To a solution of **2-10** (0.258 g, 0.785 mmol) in MeOH (3 mL) was added **2-55a** (0.110 g, 0.262 mmol) in MeOH (3 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 5 h, quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl (10 mL), and removed MeOH solvent *in vacuo*. The aqueous solution was extracted with EtOAc (5 mL x 3). The combined organic layers were washed with 1N HCl (5 mL), sat. NaHCO<sub>3</sub>, brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/3) to give **2-60** (0.151 g, 85%, an inseparable mixture of diastereomers) as yellow amorphous solid:

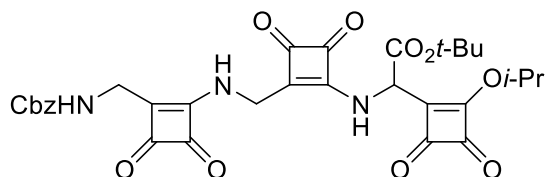
FTIR (neat) 3296, 3019, 2982, 1788, 1738, 1602, 1520, 1388, 1374, 1321, 1250, 1215, 1154, 1095  $\text{cm}^{-1}$ ;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup> calcd for  $[\text{C}_{34}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{O}_{12}\text{-H}]^-$  680.2461, found 680.2446.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-60** in  $\text{CDCl}_3$ .

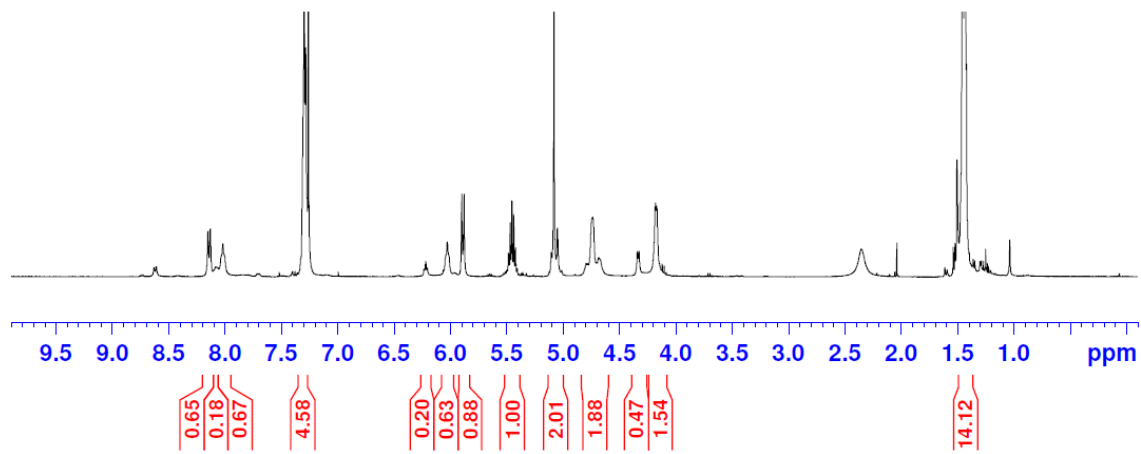


### Cbz-SqGly-SqGly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-O*i*-Pr (**2-61**)

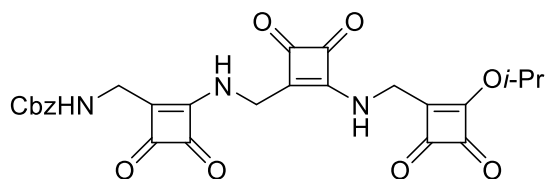


To a solution of **2-60** (150 mg, 0.220 mmol) in  $(\text{CH}_2\text{Cl}_2)_2$  (2 mL) was added  $\text{Sc}(\text{OTf})_3$  (22 mg, 0.044 mmol). The mixture was stirred for 1 h at 40 °C and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/3) to give **2-61** (109 mg, 80%) as a yellow amorphous solid. <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra show a mixture of rotamers: FTIR (neat) 3303, 2983, 2934, 1789, 1739, 1698, 1590, 1523, 1392, 1328, 1255, 1150, 1092  $\text{cm}^{-1}$ ; HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup> calcd for  $[\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{-H}]^-$  620.1886, found 620.1889.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-61** in  $\text{CDCl}_3$ .



### Cbz-SqGly-SqGly-SqGly-Oi-Pr (2-62)

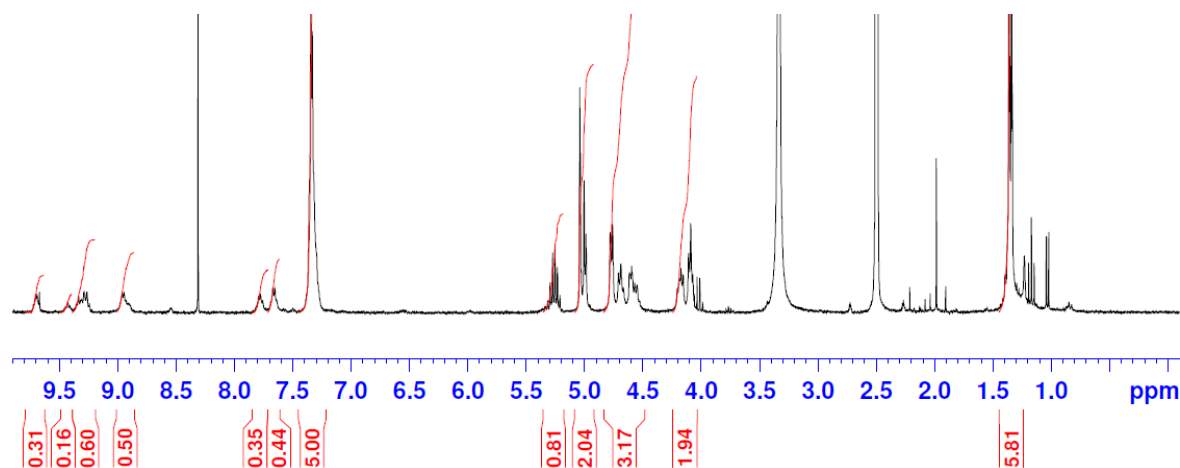


To a solution of **2-61** (77 mg, 0.124 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.2 mL) was added TFA (0.29 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. The mixture was added toluene (5 mL) and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (0-5% MeOH /  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to give **2-62** (39 mg, 60%) as an orange amorphous solid.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra show a mixture of two rotamers.:

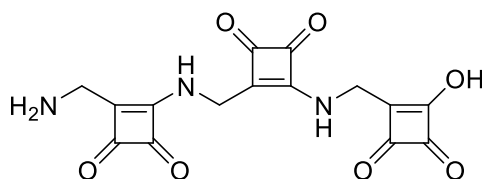
FTIR (neat) 3297, 2982, 1790, 1743, 1698, 1594, 1523, 1405, 1323, 1251, 1145, 1093 1045  $\text{cm}^{-1}$ ;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H) $^-$  calcd for  $[\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{-H}]^-$  520.1362, found 520.1355.

$^1\text{H}$  NMR spectrum of **2-62** in  $\text{DMSO-}d_6$ .



### SqGly-SqGly-Sq-Gly (2-9)



A solution of **2-62** (15 mg, 0.0287 mmol) in 30% HBr / AcOH (1 mL) was stirred at room temperature for 2 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> ( $\text{H}_2\text{O}$ ) to give **2-9** (4.3 mg, 43%) as a pale yellow powder.  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR spectra show a mixture of four rotamers:

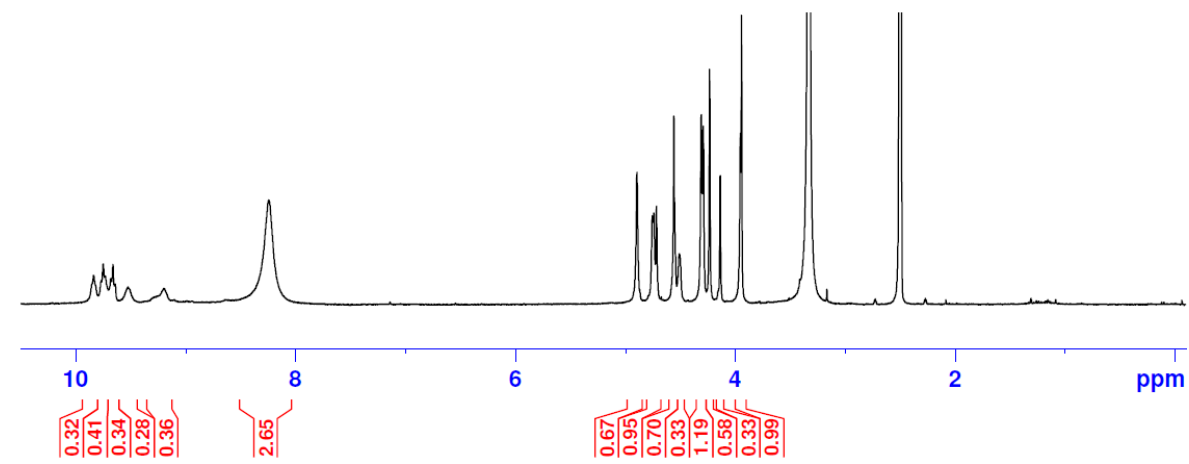
FTIR ( $\text{H}_2\text{O}$ ) 3491, 1791, 1607, 1328, 1270  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^{13}\text{C}$  NMR (150 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  217.4, 217.1, 216.9, 216.6, 198.2, 198.1, 197.8, 197.7, 194.6, 194.5, 194.2, 194.12, 194.10, 194.05, 193.5, 193.4, 189.5, 189.4, 189.3, 189.2, 189.0, 188.9, 188.8, 188.7, 182.2, 182.0, 181.9, 181.8, 181.7, 181.6, 181.5, 181.4, 177.49, 177.46, 177.1, 176.9, 162.7, 162.6,

162.3, 161.8, 160.0, 159.9, 159.8, 159.7, 40.0, 38.9, 38.6, 38.31, 38.30, 38.14, 38.09, 38.06, 34.3, 33.9, 33.2, 33.1;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>-H]<sup>-</sup> 344.0524, found 344.0515.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **2-9** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.

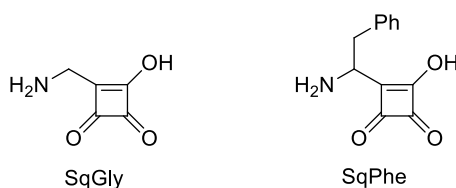


## **References for chapter 2**

- 1) Shinada, T.; Ishida, T.; Hayashi, K.; Yoshida, Y.; Shigeri, Y.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7614.
- 2) Ishida, T.; Shinada, T.; Ohfuné, Y. *Synthesis* **2005**, 2723.
- 3) Ishida, T.; Shinada, T.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 311.
- 4) Shinada, T.; Yamasaki, A.; Kiniwa, Y.; Shimamoto, K.; Ohfuné, Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4354.
- 5) Shinada, T.; Hamada, M.; Miyoshi, K.; Higahino, M.; Umezawa, T.; Ohfuné, Y. *Synlett* **2010**, 2141.

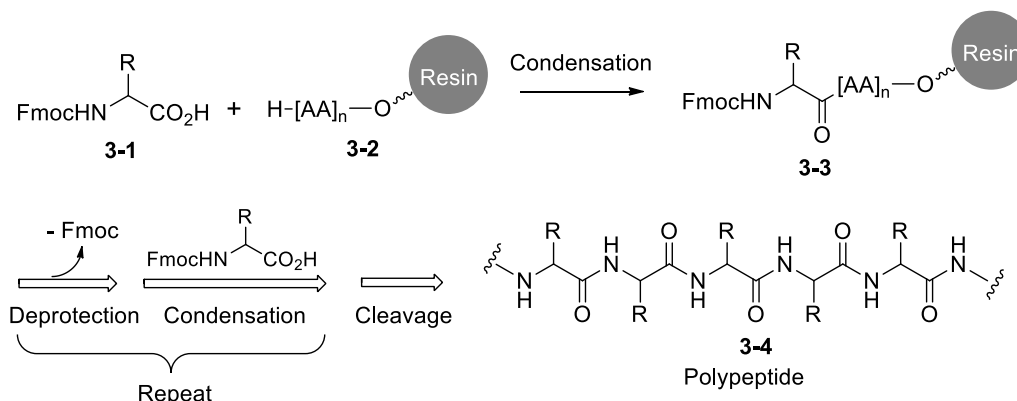
### 第三章 固相合成による $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成

第二章では、 $\alpha$ -Asq の液相中におけるペプチド化について述べた。しかし液相中における  $\alpha$ -Asq のペプチド化は、 $\alpha$ -Asq の N 末端側および C 末端側のペプチド鎖を予め調製しておく必要があり、長鎖のペプチド鎖を導入するには極性の問題から困難を伴うことが予想される。この問題の解決策として  $\alpha$ -Asq の固相合成への適用を計画した。天然型アミノ酸からなるペプチドの固相合成は確立されている一方で、非天然型アミノ酸を固相合成に適用する場合、非天然型アミノ酸の固相への担持条件について新たに調査する必要がある。<sup>1)</sup> 本章では、Gly アナログである SqGly、および Phe アナログである SqPhe を固相合成(Fmoc 法)によって導入する手法について述べる。



#### 3-1. 固相合成による SqGly のペプチド化

天然型ペプチドの固相合成におけるアミノ酸残基の伸長は、樹脂上の N 末端アミノ酸 **3-2** に対して、Fmoc-アミノ酸 **3-1** を縮合することで行われる。これにより、ペプチドの N 末端に 1 残基のアミノ酸が伸長された **3-3** となる。そして、N 末端の Fmoc 基の脱保護とアミノ酸残基の導入を繰り返し行うことで、順次ペプチド鎖を伸長していく。最後に、樹脂からペプチド鎖を切り落とすことでポリペプチド **3-4** が得られる (Scheme 3-1)。<sup>2)</sup>



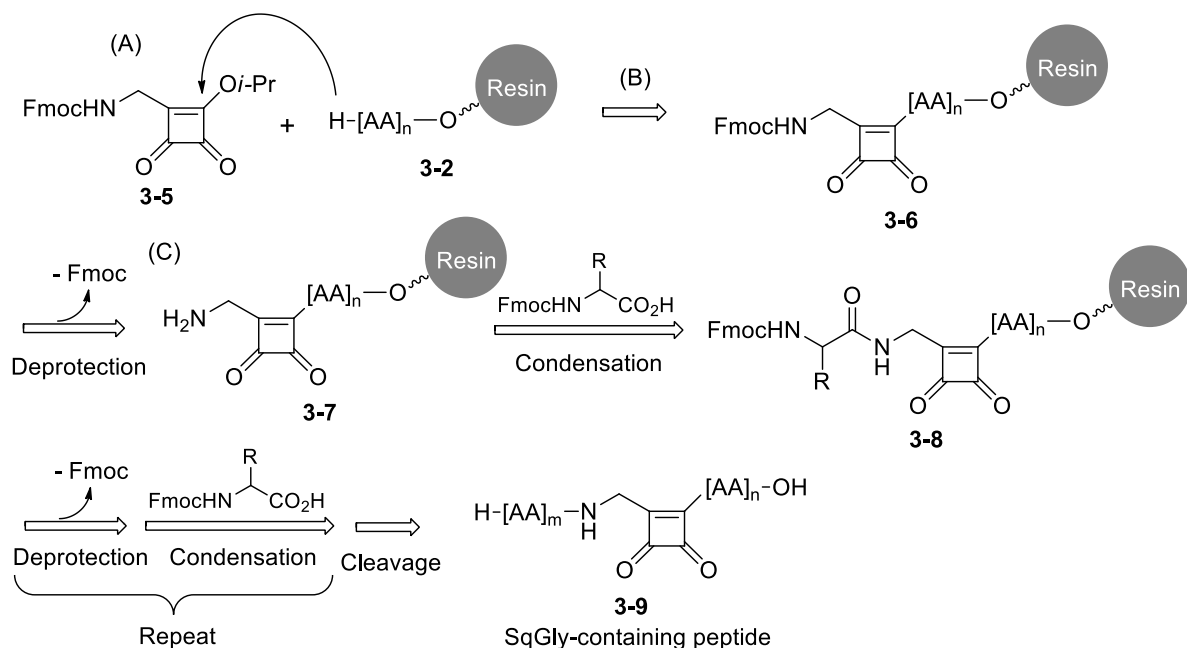
**Scheme 3-1.**

#### 固相合成を用いた SqGly 含有ペプチドの合成計画

まずは最も単純な SqGly の固相合成によるペプチドへの組み込みを計画した。天然型のペプチド固相合成に用いられる Fmoc-アミノ酸 **3-1** と等価なユニットとして、Fmoc-SqGly-Oi-Pr **3-5** が利用できると考えた。**3-5** を用いた Sq-Gly のペプチド化の計画を Scheme 3-2 に示す。まず固相に担持されたアミノ酸 **3-2** と Fmoc-SqGly-Oi-Pr **3-5** の縮合によ

り SqGly を固相に担持させ、**3-6** とする。**3-6** の N 末端の Fmoc 基を脱保護することにより、フリーアミン **3-7** とし、**3-7** に対して Fmoc-アミノ酸を縮合することにより、SqGly の N 末端側を伸長した **3-8** とする。以降は、天然型のペプチド合成と同様に Fmoc 基の脱保護と N 末端の伸長を繰り返して行い、樹脂から切り落とすことで SqGly 含有ペプチドアナログ **3-9** を合成できると考えた。

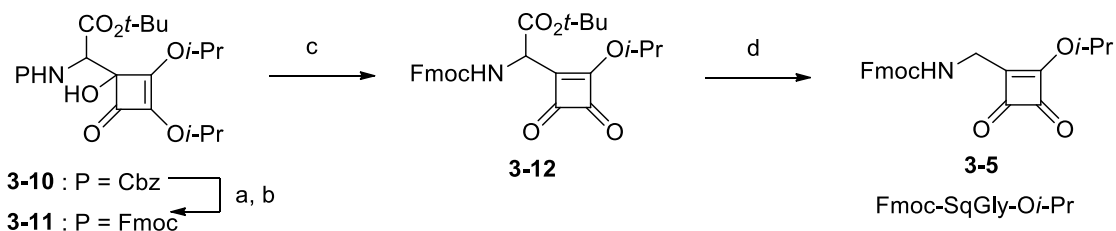
Scheme 3-2 の合成計画の成功には、(A) 前例のない Fmoc 体 **3-5** の合成、(B) 樹脂上のアミノ酸との縮合による **3-5** の固相への担持と、(C) SqGly の N 末端伸長のための脱 Fmoc 化によるフリーアミン **3-7** の生成、の 3 点を確認する必要がある。まずは、**3-5** の合成を行った。



**Scheme 3-2.**

### Fmoc-SqGly-Oi-Pr **3-5** の合成

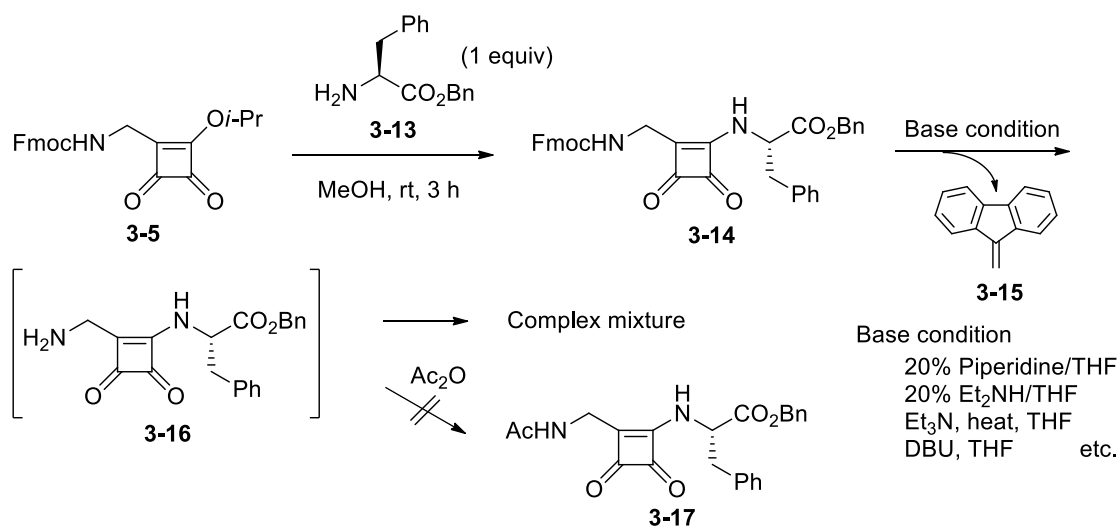
Fmoc-SqGly-Oi-Pr **3-5** は、Cbz-Gly から誘導したヒドロキシシクロブテノン **3-10** から始め、Cbz 基の Fmoc 基への掛け替えにより **3-11** を得た。**3-11** の塩酸処理によって Sq-エステル **3-12** へ変換し、続く TFA 処理によって *tert*-ブトキシカルボニル基を除去し、**3-5** を合成できた (Scheme 3-3)。



**Scheme 3-3.** (a)  $\text{H}_2$ , Pd-C (20 wt%), MeOH, rt, 3 h; (b) Fmoc-OSu (1 eq.), MeCN, rt, 4 h, 2 steps 81%; (c) 12N HCl (1 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 3 h, 80%; (d) TFA (30 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C to rt, 12 h, 76%.

### 3-5 の液相中における脱 Fmoc 化の試み

Fmoc-SqGly-Oi-Pr **3-5** を用いて液相中での C 末端側へのアミノ酸残基の導入と脱 Fmoc 化を試みた (Scheme 3-4)。まず、H-Phe-OBn **3-13** との縮合はメタノール溶媒中で容易に進行し、ジペプチドアナログ **3-14** を収率良く与えた。次に、**3-14** に対しピペリジンを作用させ、Fmoc 基の脱保護を試みた。しかし、反応溶液は時間経過に従って黒く変化し、複雑な混合物を与えた。Et<sub>2</sub>NH や DBU、Et<sub>3</sub>N など様々な塩基で Fmoc 基の脱保護を試みたが、同じ結果となった。<sup>1</sup>H NMR による解析では、Fmoc 基の脱離によって得られる 9-メチレン-9H-フルオレン **3-15** の生成が確認されていることから、脱 Fmoc 化後のアミン **3-16** が分解していることが示唆された。そのため、脱 Fmoc 化後のフリーアミン **3-16** に対して、無水酢酸によるトラップを試みた。しかしながら、アセチル化された生成物 **3-17** は得られなかった。以上の結果から、**3-14** の脱 Fmoc 化は進行するものの、フリーアミン **3-16** が不安定であり、速やかに分解することがわかった。

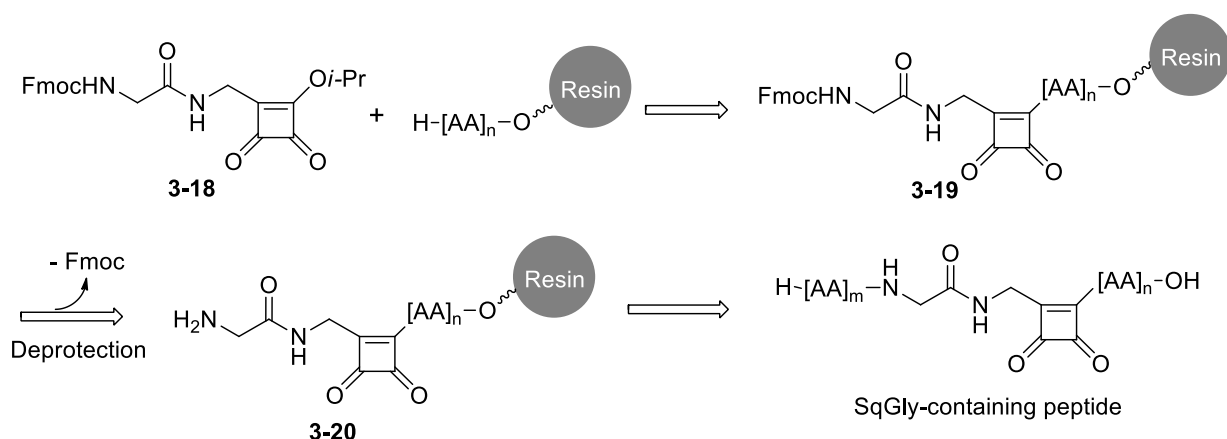


Scheme 3-4.

### ジペプチドユニット **3-18** の利用

**3-5** の N 末端の伸長が困難であることがわかったため、次に SqGly の固相ペプチド化を行うための基質として、Sq-Gly の N 末端に天然型のアミノ酸が結合したジペプチドユニット **3-18** を想定した (Scheme 3-5)。**3-18** を固相に担持して **3-19** とし、続く Fmoc 基の脱保護によりフリーアミン **3-20** を得る計画である。これにより、アミン体 **3-16** で見られた分解を防げるのではないかと考えた。

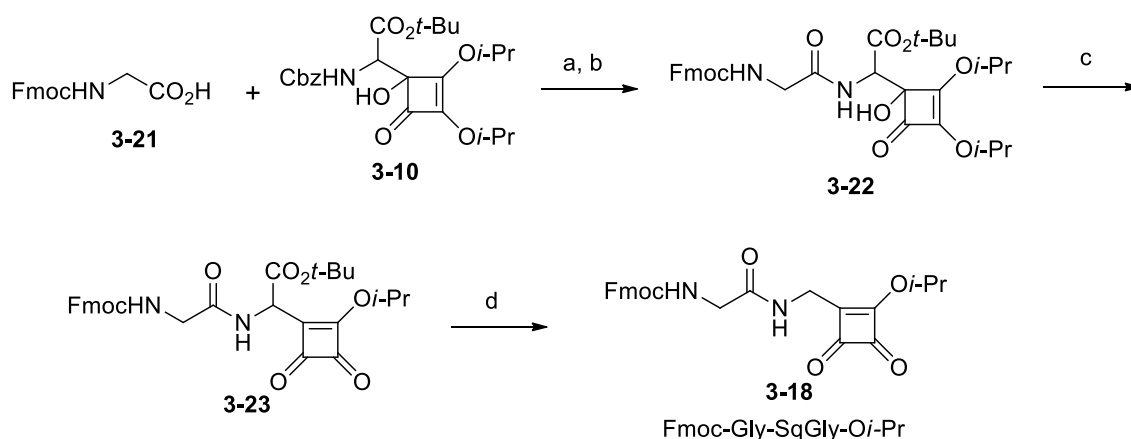




**Scheme 3-5.**

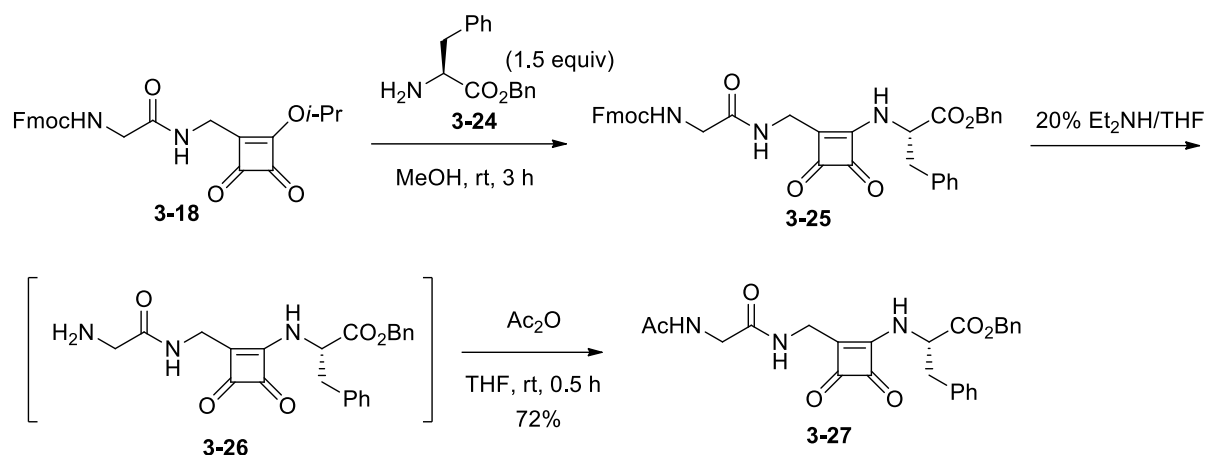
### ジペプチドユニット **3-18** の合成

ジペプチドユニット **3-18** の合成を行った(Scheme 3-6)。まず、ヒドロキシシクロブテノン **3-10** の Cbz 基を脱保護し、Fmoc-Gly-OH **3-21** を EDCI を用いて縮合することで **3-22** とした。その後、**3-5** の合成と同様に、二段階の酸処理を経てジペプチドユニット **3-18** を得た。



**Scheme 3-6.** (a)  $\text{H}_2$ , Pd-C (20 wt%), MeOH, rt, 3 h; (b) EDCI (1 eq.), THF, rt, 4 h, 2 steps, 98%; (c) 12N HCl (1 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt, 3 h, 70%; (d) TFA (30 eq.),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 0 °C to rt, 12 h, 69%.

次に **3-18** の液相中における C 末端側へのアミノ酸残基の導入と脱 Fmoc 化を試みた(Scheme 3-7)。**3-18** と H-Phe-OBn **3-24** の縮合によりトリペプチドアナログ **3-25** を得た。**3-25** に対して  $\text{Et}_2\text{NH}$  による Fmoc 基の脱保護を試みた。その結果、アミン **3-26** と思われるスポットがニンヒドリンを用いた TLC 解析によって得られた。しかし、**3-26** の単離は困難であったため、減圧濃縮後すぐに無水酢酸で処理することで、相当するアセチルアミド体 **3-27** を 72% 収率で得ることができた。この結果から、ジペプチドユニット **3-18** を固相に担持できれば、**3-18** の N 末端から生じるフリーアミンを足掛かりに N 末端の伸長が行える可能性が示唆された。

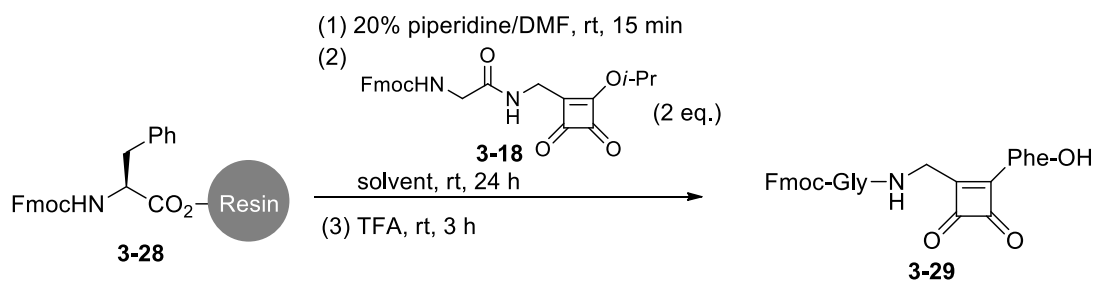


**Scheme 3-7.**

### ジペプチドユニット **3-18** の固相担持

次に、ジペプチドユニット **3-18** の固相担持条件を調査した (Table 3-1)。Fmoc-Phe-OH が担持された固相合成用樹脂 **3-28** を用いて行い、(1) 樹脂の N 末端 Fmoc 基の脱保護、(2) 2 当量のジペプチドユニット **3-18** を用いた SqGly の固相担持、(3) TFA 処理によるペプチドの樹脂からの切り出し、の 3 つの操作により、トリペプチドアナログ **3-29** が収率よく得られる条件を精査した。その結果、Trityl 樹脂や Clear 樹脂を用いた場合には、望む生成物 **3-29** は全く得られなかった (entry 1, 2)。一方で、Alko (Wang) 樹脂を用いた場合に **3-29** が 43% 収率で得られ、ジペプチドユニット **3-18** の固相担持に成功した (entry 3)。酢酸エチルを溶媒として用いると、67% まで収率を改善できた (entry 4)。反応を加速させるため、DIEA を塩基として用いたが、収率は 49% に低下した (entry 5)。DIEA を用いた場合の収率の低下は、後に考察する塩基性条件下における **3-18** の分解反応が要因であると考えられる。収率の改善に向けて、ジペプチドユニット **3-18** との反応を 2 回繰り返し行うことにした。その結果、トリペプチドアナログ **3-29** の収率を 80% まで改善できた (entry 6)。

**Table 3-1.** Solid-phase support of dipeptide unit **18**.



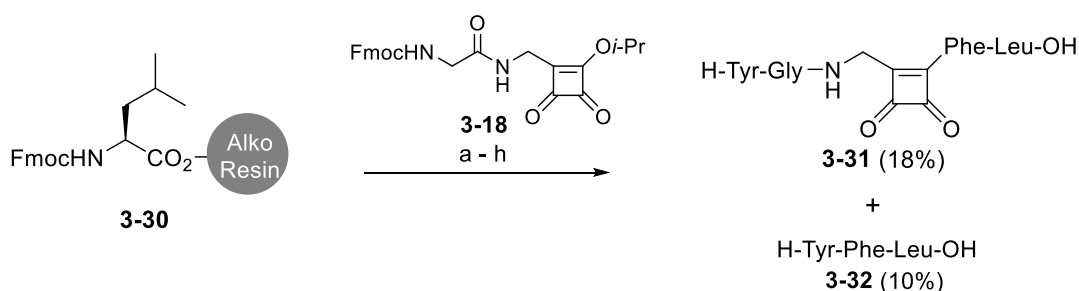
entry	resin	solvent	yield (%)
1	Tryl-resin	THF	0
2	Clear-resin	THF	0
3	Alko-resin	THF	43
4	Alko-resin	AcOEt	67
5 <sup>a</sup>	Alko-resin	AcOEt	49
6 <sup>b</sup>	Alko-resin	AcOEt	80

<sup>a</sup> DIEA (1 eq.) was added.

<sup>b</sup> Twice repeating the reaction with **3-18**. [Proceduer : (1), (2) x2, (3)].

### SqGly 含有エンケファリンアナログの合成

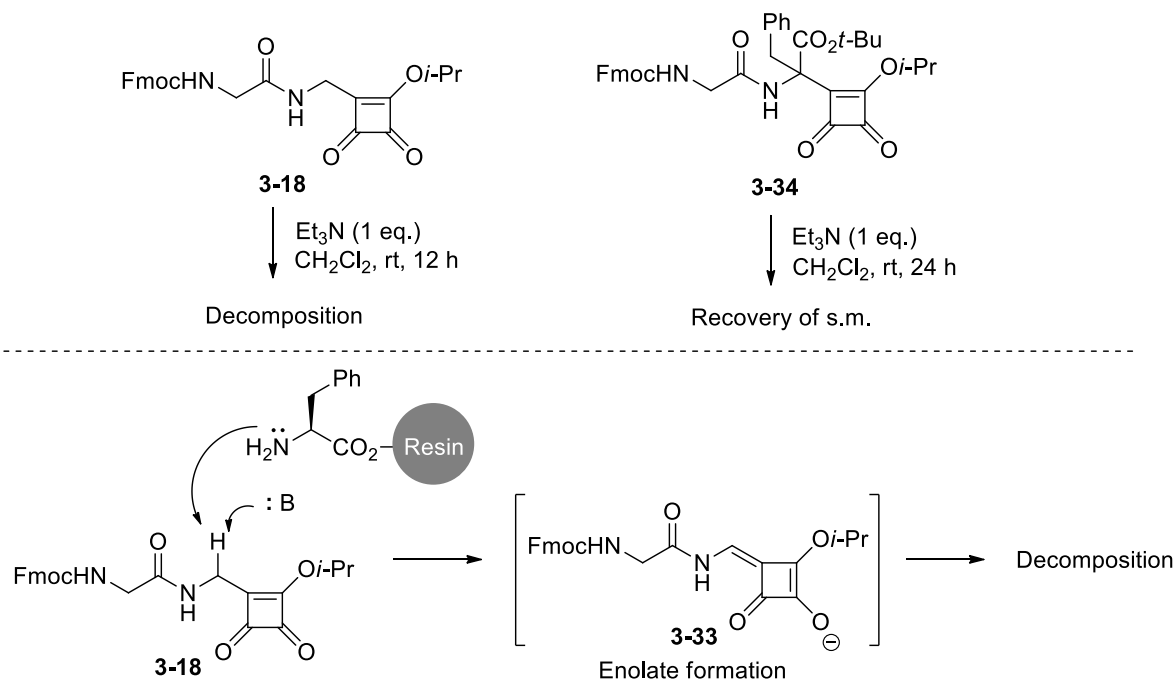
ジペプチドユニット **3-18** を用いた SqGly の固相担持に成功したため、本合成法を用いて第二章において液相で合成に成功しているエンケファリンアナログ **3-31** の合成を試みた (Scheme 3-8)。Fmoc-Leu-OH が担持された Alko-樹脂 **3-30** に対し、ジペプチドユニット **3-18** の固相への担持と、その後の N 末端への Tyr の縮合を順次行った。最後に樹脂からの切り出しを行うことにより、18% 収率で **3-31** を得ることができた。この際、ジペプチドユニットが導入されなかったトリペプチド **3-32** が副生成物として得られた。



**Scheme 3-8.** (a) 20% piperidine/DMF, rt, 15 min; (b) Fmoc-Phe-OH (4 eq.), HOBt (4 eq.), HBTU (3.6 eq.), DIEA (8 eq.), DMF, rt, 1 h; (c) 20% piperidine/DMF, rt, 15 min; (d) **3-18** (2 eq.), AcOEt, rt, 24 h. (x 2); (e) 20% Et<sub>2</sub>NH/DMF, rt, 15 min; (f) Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (4 eq.), HOBt (4 eq.), HBTU (3.6 eq.), DIEA (8 eq.), DMF, rt, 1 h; (g) 20% Et<sub>2</sub>NH/DMF, rt, 15 min; (h) TFA, rt, 3 h.

### ジペプチドユニット **3-18** の分解メカニズムの調査

ジペプチドユニット **3-18** の固相への担持に成功したものの、固相担持の反応終了後の濾液の TLC を確認したところ、過剰に用いているジペプチドユニット **3-18** が消失し、分解していることが確認された。そのため、この分解のメカニズムを調査することにした。**3-18** の固相担持条件における分解反応を調査するためにブランク実験を行った (Scheme 3-9)。**3-18** に対して  $\text{Et}_3\text{N}$  を作用させたところ、12 時間後には原料が完全に消失し、複雑な分解物を与えた。この結果から、Sq 基の電子求引性によって活性化された  $\alpha$  位のメチレンプロトンが引き抜かれて生じるエノラート **3-33** の形成が分解反応の引き金になっているのではないかと仮説を立てた。実際、エノラート形成が起こらない  $\alpha$  位が四級炭素となっている **3-34** は塩基にさらしても分解せず、24 時間後も原料が定量的に回収された。この結果からも、**3-18** の分解反応は、 $\alpha$  位のプロトンによる引き抜きが原因であることが示唆された。固相担持条件における **3-18** の分解は、樹脂上のアミンの塩基性によって分解していくのではないかと考えられる。



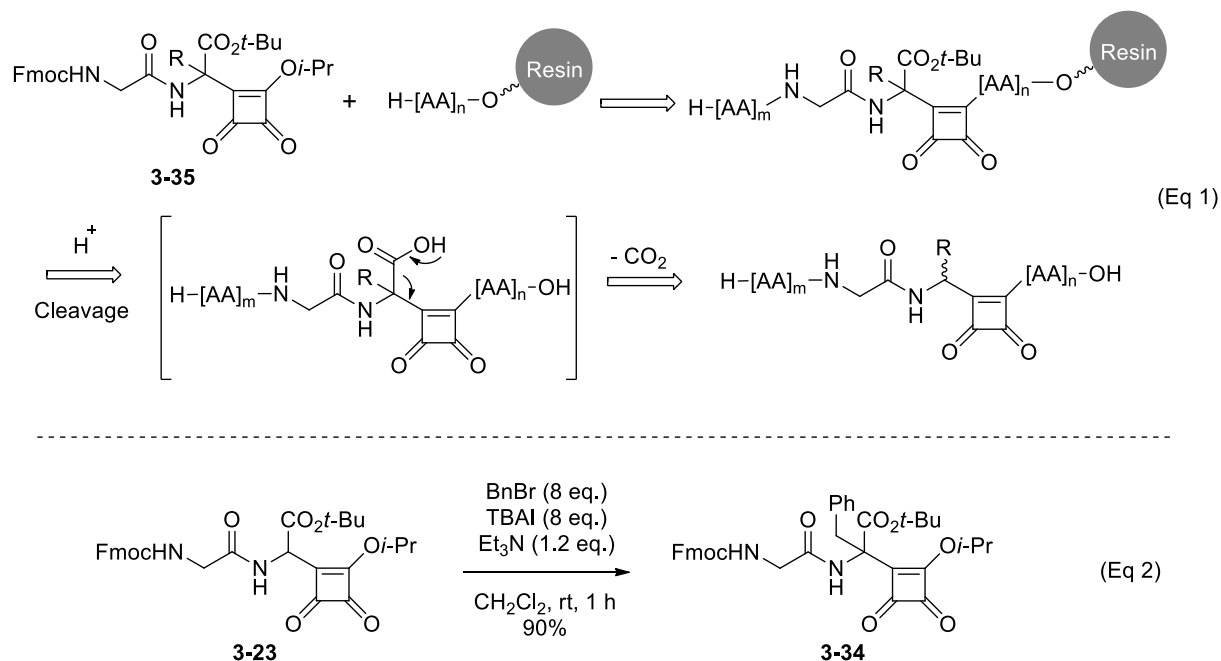
Scheme 3-9.

### 3-2. 固相合成による SqPhe のペプチド化

#### SqPhe の固相担持ジペプチドユニット

**3-18** の分解反応の考察を踏まえて、 $\alpha$  位に置換基を導入した  $\alpha$ -Asq の固相担持には、 $\alpha$  位に *tert*-ブトキシカルボニル基を残したジペプチドユニット **3-35** を用いる計画を立てた (Scheme 3-10, Eq 1)。**3-35** は  $\alpha$  位が四級炭素となっているため、固相担持条件における分解

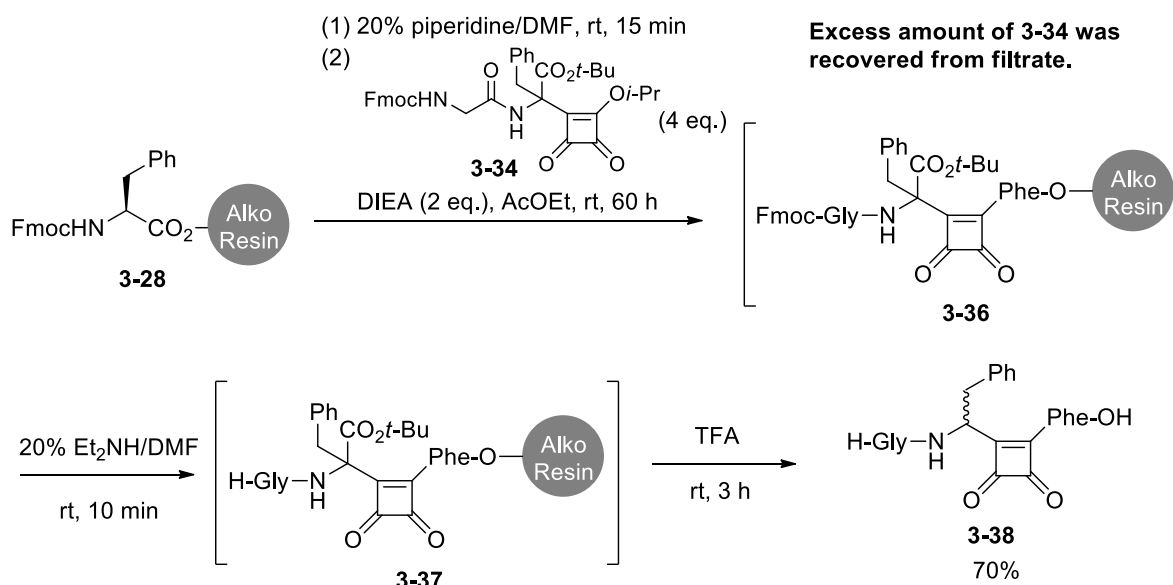
反応を防ぎ、また担持条件に塩基を用いることも可能になると考えられる。この場合、 $\alpha$  位の *tert*-ブトキシカルボニル基は、最終段階での酸処理による樹脂からの切り出しの際に同時に除去できるものと想定した。SqPhe の固相担持に用いるジペプチドユニット **3-34** は、第二章で確立したアルキル化によって、**3-23** から 90% 収率で合成できた(Eq 2)。



**Scheme 3-10.**

#### ジペプチドユニット **3-34** の固相担持

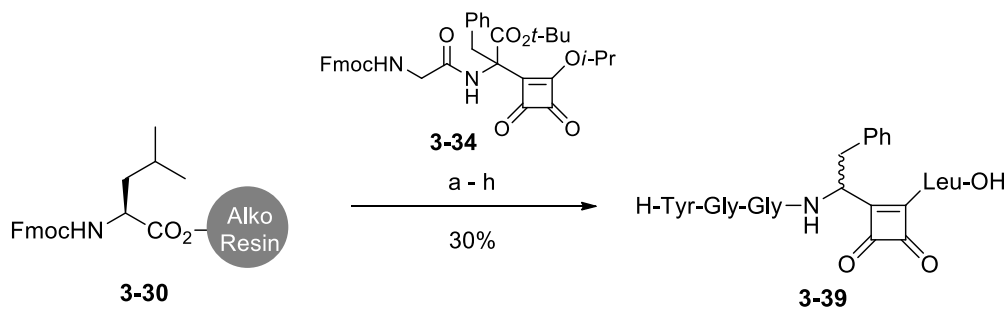
ジペプチドユニット **3-34** を用いて固相担持を行った(Scheme 3-11)。Fmoc-Phe-OH が担持された Alko 樹脂 **3-28** に対し、Fmoc 基を脱保護した後、2 当量の DIEA の存在下、4 当量の **3-34** を作用させて固相担持を行い、**3-36** とした。その後、N 末端の Fmoc 基を脱保護し **3-37** とした後、TFA 処理による樹脂からの切り出しによりトリペプチドアナログ **3-38** の合成を行った。その結果、固相担持には 60 時間を必要としたものの、望むトリペプチドアナログ **3-38** を 70% 収率で得ることができた。反応に長時間を要した理由は、Sq-エステルの  $\alpha$  位が嵩高くなったことで反応点の立体障害が大きくなったためと考えられる。本反応では、Fmoc-Gly-SqGly-Oi-Pr **3-18** を用いた場合とは異なり、反応終了後の濾液から過剰量分の **3-34** を回収することができた。



**Scheme 3-11.**

### SqPhe 含有エンケファリンアナログの合成

ジペプチドユニット **3-34** を用いて SqPhe を含むエンケファリンアナログ **3-39** の合成を試みた(Scheme 3-12)。Fmoc-Leu-OH が担持された Alko-樹脂 **3-30** に対し、ジペプチドユニット **3-34** の固相への担持と、その後の N 末端への Gly および Tyr の縮合を順次行った。最後に樹脂からの切り出しによって 30% 収率で **3-39** の合成に成功した。

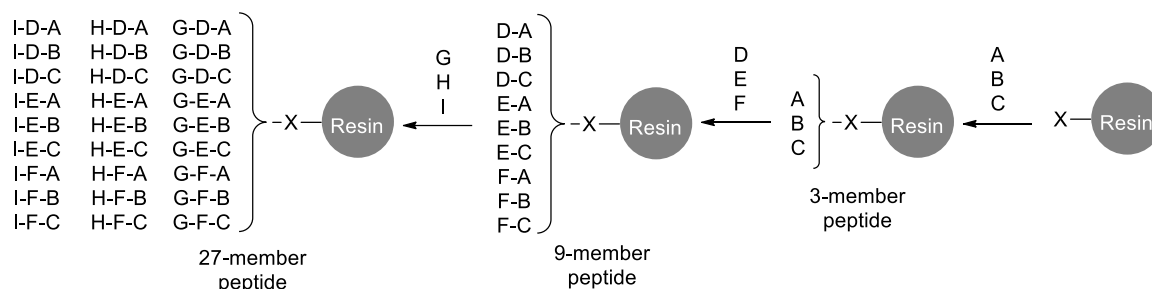


**Scheme 3-12.** (a) 20% piperidine/DMF, rt, 15 min; (b) **3-34** (4 eq.), DIEA (2 eq.), AcOEt, rt, 60 h; (c) 20% Et<sub>2</sub>NH/DMF, rt, 15 min; (d) Fmoc-Gly-OH (4 eq.), HOBT (4 eq.), HBTU (3.6 eq.), DIEA (8 eq.), DMF, rt, 1 h; (e) 20% Et<sub>2</sub>NH/DMF, rt, 15 min; (f) Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (4 eq.), HOBT (4 eq.), HBTU (3.6 eq.), DIEA (8 eq.), DMF, rt, 1 h; (g) 20% Et<sub>2</sub>NH/DMF, rt, 15 min; (h) TFA, rt, 3 h.

以上のように、 $\alpha$  位を四級炭素としたジペプチドユニット **3-34** を用いることで SqPhe の固相合成によるペプチド化を確立することができた。

### 3-3. $\alpha$ -Asq 含有ペプチドアナログライブラリーの構築と生物活性試験

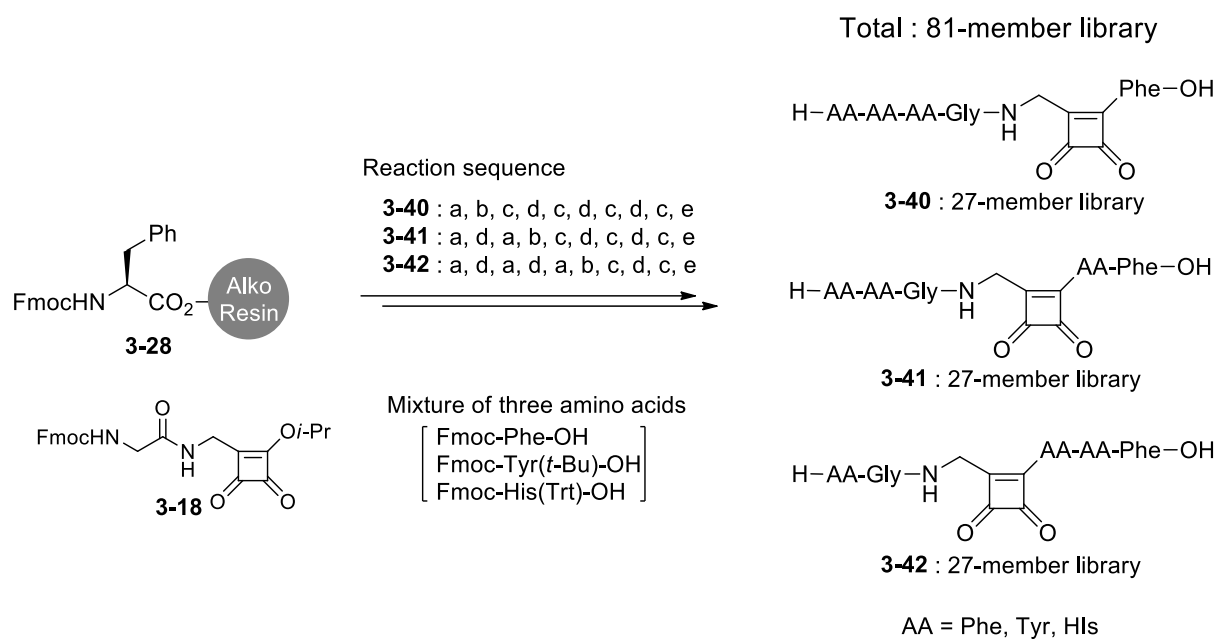
固相合成による SqGly および SqPhe のペプチド化を確立できたため、次に  $\alpha$ -Asq 含有ペプチドライブラリーの構築を計画した。固相ペプチド合成におけるペプチドの N 末端伸長の各段階において、3 種類の混合均一化させたアミノ酸との縮合を行うことにより、その段階において 3 種類のアミノ酸で N 末端を伸長させた、3 つのペプチドを合成できる。この操作を 3 回繰り返せば、理論上  $3^3 = 27$  つのペプチドを一挙に構築できる(Figure 3-1)。



**Figure 3-1.** Peptide library synthesis by solid-phase peptide synthesis.

#### SqGly 含有ペプチドアナログライブラリーの構築

SqGly 含有ペプチドアナログライブラリーの構築を行った(Scheme 3-13)。Fmoc-Phe-OH が担持された Alko 樹脂 **3-28** に対し、ジペプチドユニット **3-18** を用いて SqGly を固相に担持した後に、Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH の混合物を用いた N 末端伸長を 3 回繰り返した。これにより 27 つの異なる配列を持つライブラリー **3-40** の構築に成功した。さらに **3-18** の導入位置を変えたペプチドアナログライブラリー **3-41**, **3-42** を構築し、アミノ酸配列の異なる合計 81 のペプチドアナログを含むライブラリーを構築できた。



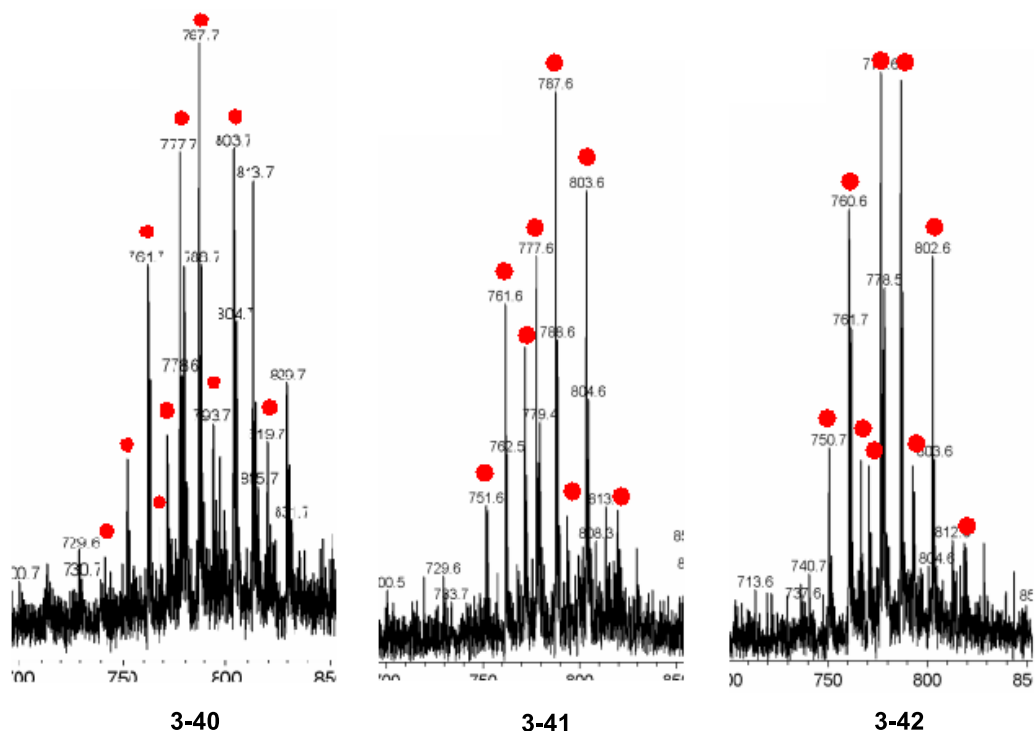
**Scheme 3-13.** (a) 20% piperidine/DMF, rt, 15 min; (b) **3-18** (2 eq.), AcOEt, rt, 24 h, (Twice repeat); (c) 20% Et<sub>2</sub>NH/DMF, rt, 15 min; (d) Fmoc-Phe-OH (1.3 eq.), Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (1.3 eq.), Fmoc-His(Trt)-OH (1.3 eq.), HOBT (4 eq.), HBTU (3.6 eq.), DIEA (8 eq.), DMF, rt, 1 h; (e) TFA, rt, 3 h.

ライブラリーに含まれる各成分の生成は MALDI TOF-MS ネガティブモードによる質量分析によって確認した (Figure 3-2)。ライブラリーを構成するペプチドアナログには、アミノ酸配列が異なっても分子量が同じものが存在する。そのため、ライブラリーに含まれるペプチドアナログの分子量は Figure 3-2 に示した 10 通りである。**3-40** ~ **3-42** の解析の結果、それぞれ望む 10 本のピークを観測できた。



<i>m/z</i>	Constituent amino acid	<i>m/z</i>	Constituent amino acid	<i>m/z</i>	Constituent amino acid
742	His, His, His, Gly-SqGly, Phe	772	Phe, Phe, Phe, Gly-SqGly, Phe	794	His, Tyr, Tyr, Gly-SqGly, Phe
752	Phe, His, His, Gly-SqGly, Phe	778	Phe, His, Tyr, Gly-SqGly, Phe	804	Phe, Tyr, Tyr, Gly-SqGly, Phe
762	Phe, Phe, His, Gly-SqGly, Phe	788	Phe, Phe, Tyr, Gly-SqGly, Phe	820	Tyr, Tyr, Tyr, Gly-SqGly, Phe
768	His, His, Tyr, Gly-SqGly, Phe				

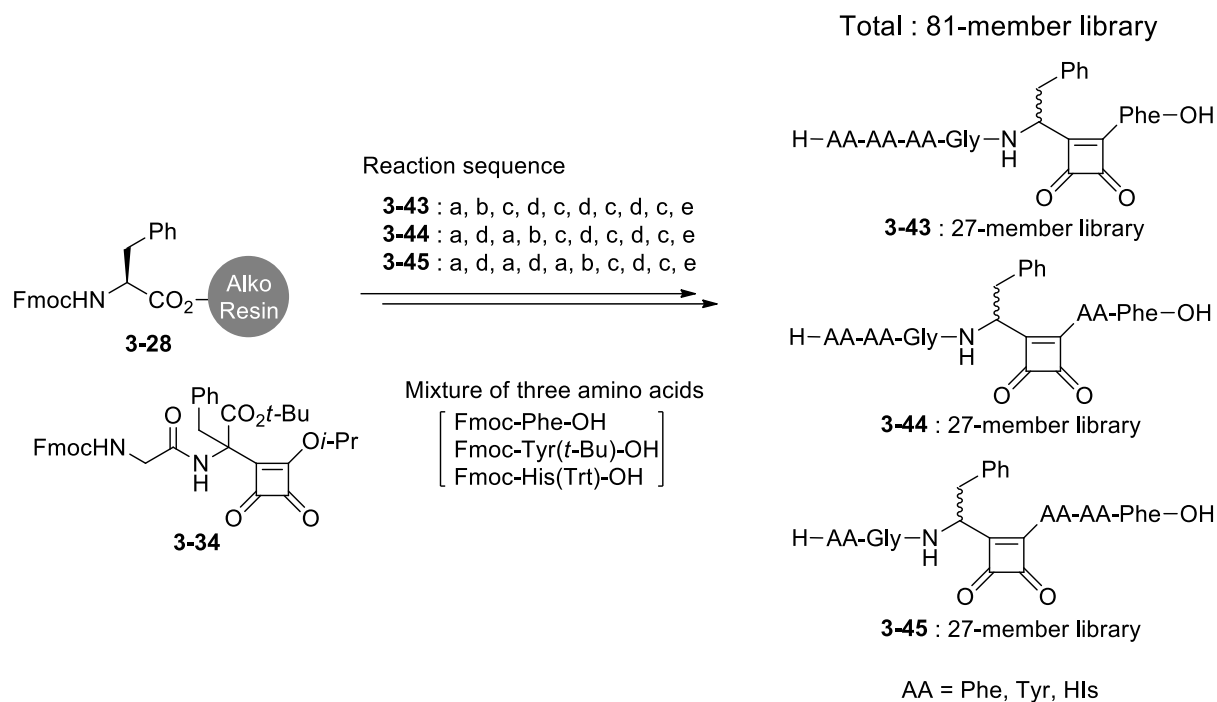
● ; SqGly-containing peptide



**Figure 3-2.** MALDI-TOF MS analysis of library **3-40** ~ **3-42**. Negative mode. Matrix :  $\alpha$ -CHCA,

### SqPhe 含有ペプチドアナログライブラリーの構築

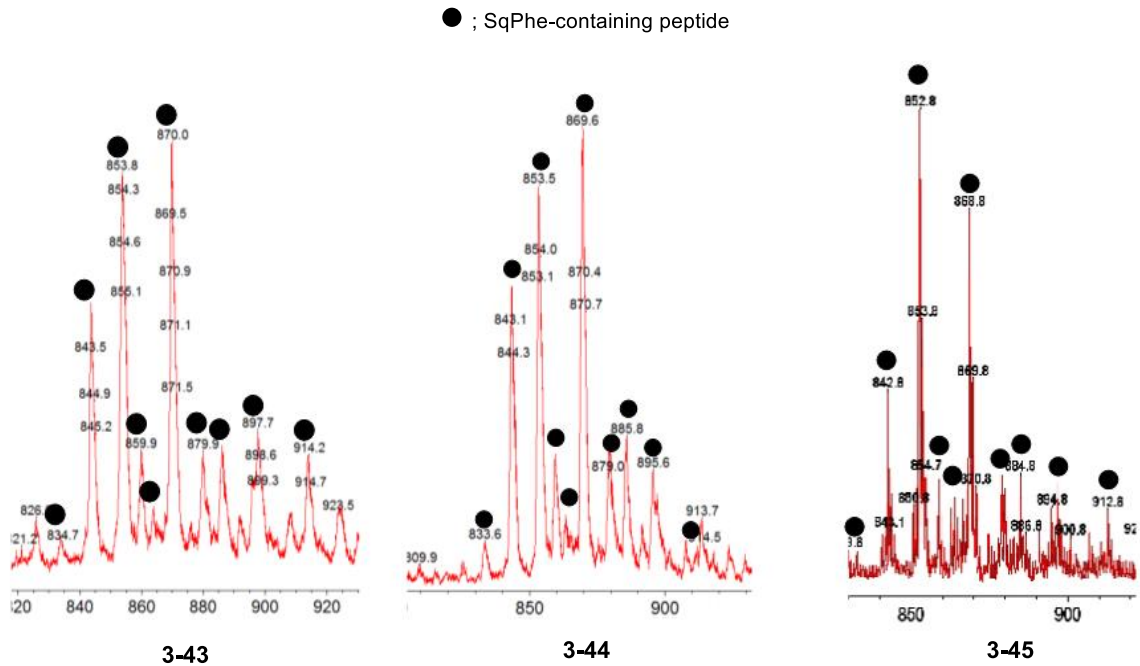
SqGly を組み込んだライブラリーの合成と同様に、SqPhe を組み込んだペプチドアナログライブラリーの構築を行った(Scheme 3-14)。Alko 樹脂 **3-28** に対し、ジペプチドユニット **3-34** を用いた SqPhe ユニットの導入と Fmoc-Phe-OH、Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH、Fmoc-His(Trt)-OH の混合物を用いた N 末端伸長を 3 回行うことによりそれぞれ 27 つの異なる配列を持つライブラリー **3-43** ~ **3-45** を構築し、合計 81 の SqPhe 含有ペプチドアナログライブラリーを構築できた。



**Scheme 3-14.** (a) 20% piperidine/DMF, rt, 15 min; (b) **3-34** (4 eq.), DIEA (2 eq.), AcOEt, rt, 60 h; (c) 20% Et<sub>2</sub>NH/DMF, rt, 15 min; (d) Fmoc-Phe-OH (1.3 eq.), Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH (1.3 eq.), Fmoc-His(Trt)-OH (1.3 eq.), HOBT (4 eq.), HBTU (3.6 eq.), DIEA (8 eq.), DMF, rt, 1 h; (e) TFA, rt, 3 h.

SqPhe を組み込んだライブラリー **3-43** ~ **3-45** に含まれるペプチドアナログの生成を MALDI TOF-MS ポジティブモードによる質量分析により確認した (Figure 3-3)。SqGly 含有ペプチドアナログライブラリーの場合と同様に、ライブラリーに含まれるペプチドアナログの可能な分子量は 10 通り存在し、それぞれのピークを観測することができた。

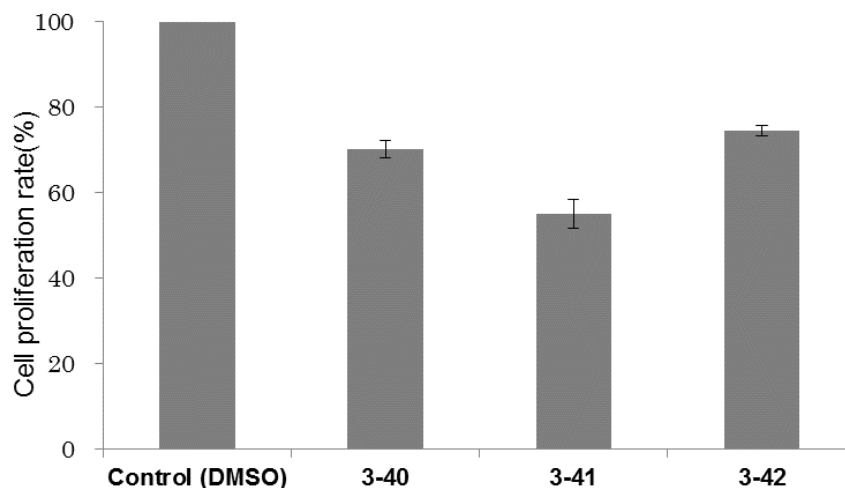
<i>m/z</i>	Constituent amino acid	<i>m/z</i>	Constituent amino acid	<i>m/z</i>	Constituent amino acid
833	His, His, His, Gly-SqPhe, Phe	863	Phe, Phe, Phe, Gly-SqPhe, Phe	885	His, Tyr, Tyr, Gly-SqPhe, Phe
843	Phe, His, His, Gly-SqPhe, Phe	869	Phe, His, Tyr, Gly-SqPhe, Phe	895	Phe, Tyr, Tyr, Gly-SqPhe, Phe
853	Phe, Phe, His, Gly-SqPhe, Phe	879	Phe, Phe, Tyr, Gly-SqPhe, Phe	911	Tyr, Tyr, Tyr, Gly-SqPhe, Phe
860	His, His, Tyr, Gly-SqPhe, Phe				



**Figure 3-3.** MALDI-TOF MS analysis of library **3-43** ~ **3-45**. Positive mode, Matrix:  $\alpha$ -CHCA.

### ペプチドライブラリーの生物活性評価

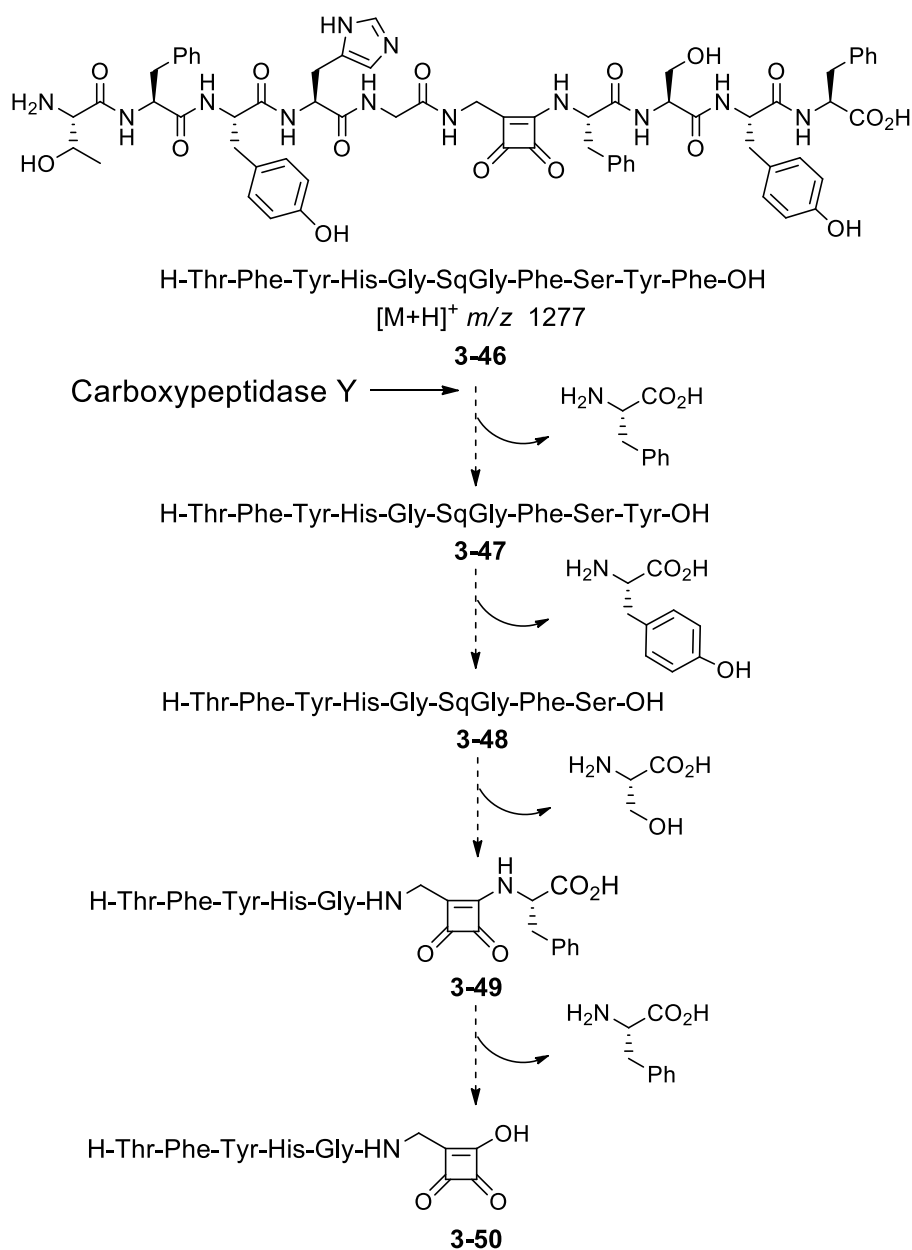
SqGly を導入したライブラリー **3-40** ~ **3-42** の生物活性を調査した。ラット肝がん細胞 (dRLh-84) の増殖抑制活性および、アセチルコリンエステラーゼに対する阻害活性を評価した。その結果、ライブラリー **3-41** は 100  $\mu$ M の濃度で dRLh-84 の増殖を 45% 抑制することが明らかとなった (Figure 3-4)。<sup>3)</sup> 一方、**3-40** ~ **3-42** のアセチルコリンエステラーゼに対する阻害活性は、測定濃度(100 mg/mL)において全く示さなかった。ライブラリーはそれぞれ 27 つのペプチドから構成されているため、dRLh-84 に対する増殖抑制活性を示した分子の同定を進めている。



**Figure 3-4.** Cell proliferation inhibitory activity of the rat hepatoma cells.

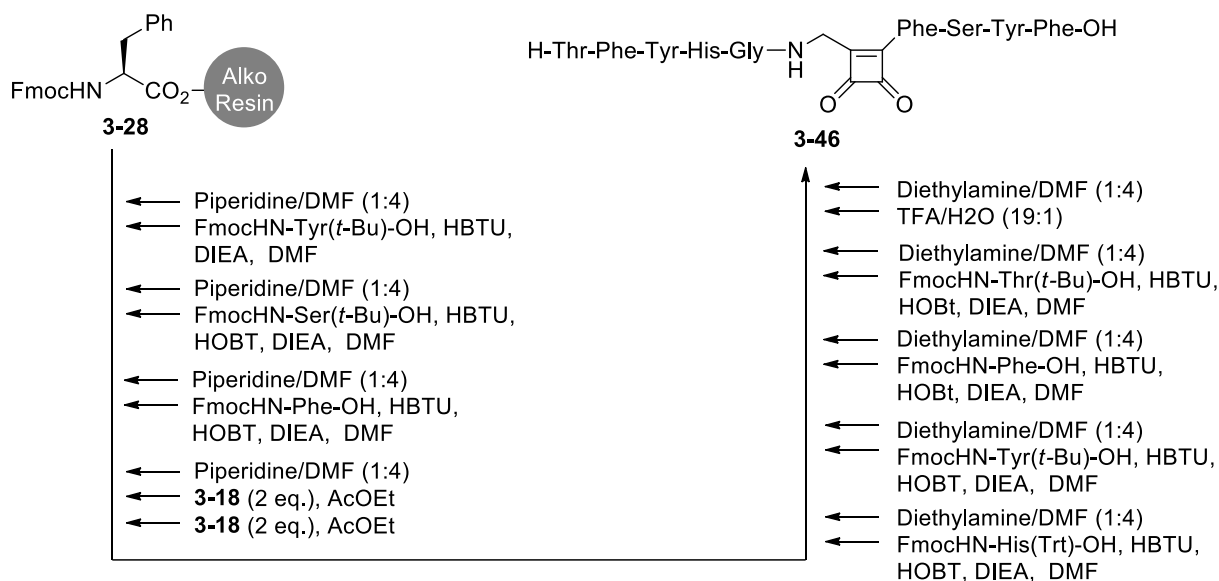
#### 3-4. 消化酵素に対する抵抗性評価

$\alpha$ -Asq は非天然型アミノ酸であるため、酵素に対する抵抗性が期待できる。固相合成によって SqGly を導入したデカペプチドアナログ **3-46** を合成し、消化酵素カルボキシペプチダーゼ Y (CPDY)<sup>4)</sup> に対する抵抗性を検証することにした(Figure 3-5)。CPDY はペプチド鎖を C 末端側から 1 残基ずつ切断していく消化酵素である (Lys、Arg が C 末端の場合は除く)。消化酵素に対する抵抗性を示した場合においても、その抵抗性が隣接アミノ酸のどの位置にまで及ぶのかが興味深いため、酵素による基質切断過程を分子量の経時的変化を解析することによって評価する。



**Figure 3-5.** SqGly-containing decapeptide **3-46**.

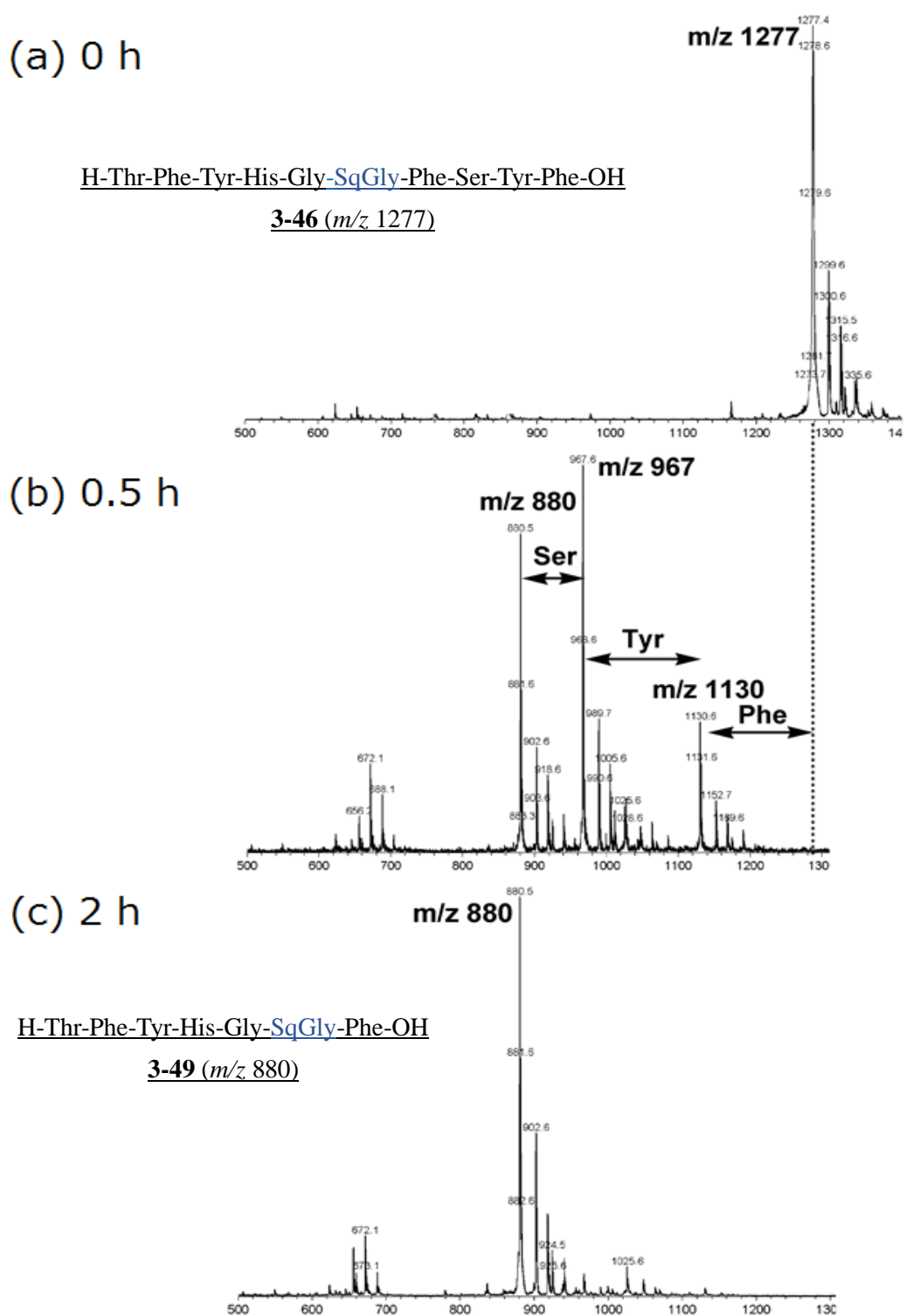
基質となるデカペプチド **3-46** の合成は、ジペプチドユニット **3-18** を用いて Scheme 3-15 に示した手順で行った。樹脂を除去した後、RP-HPLC により精製した。



**Scheme 3-15.**

#### カルボキシペプチダーゼに対する抵抗性評価

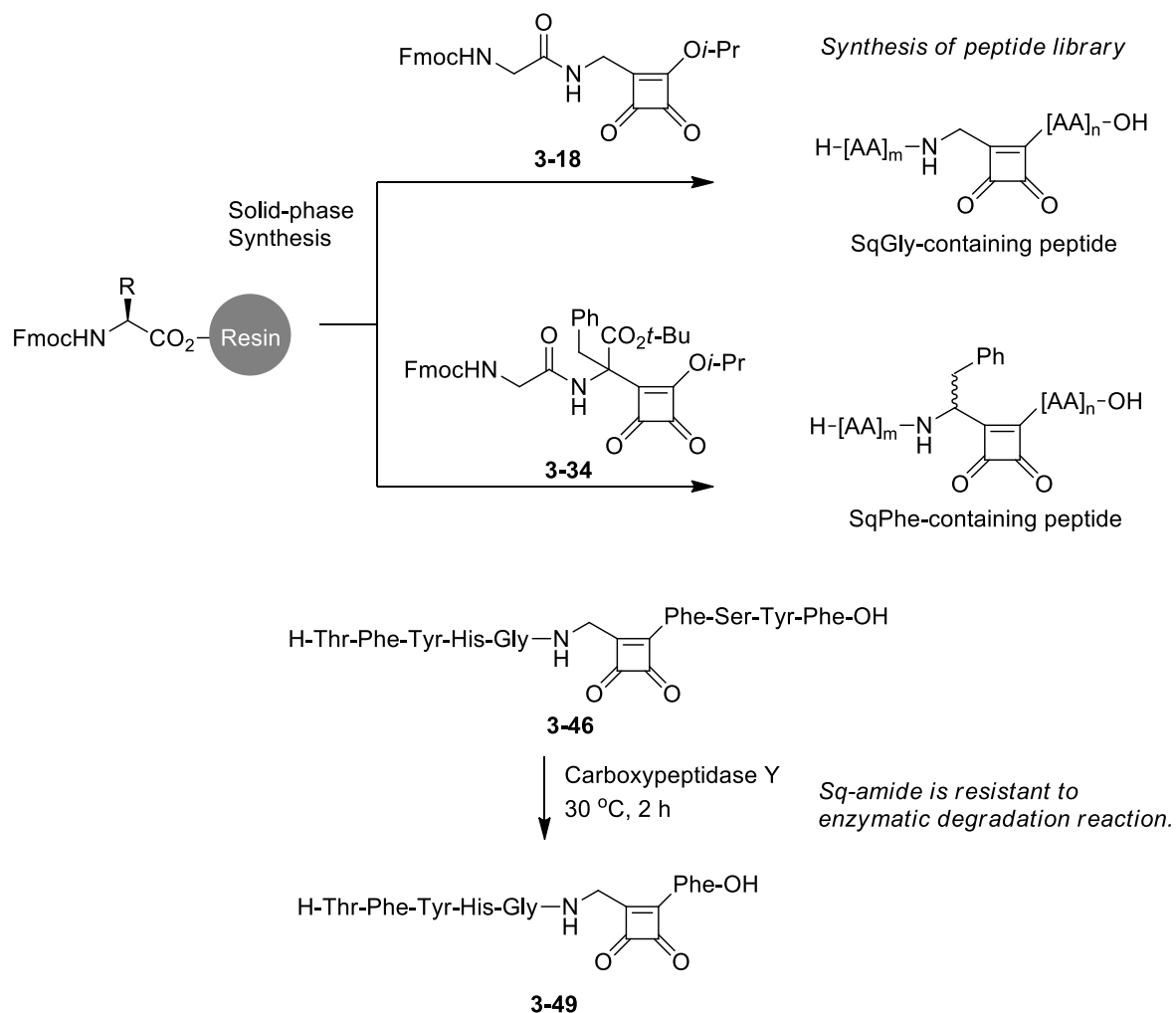
デカペプチドアナログ **3-46** を用いて CPDY に対する酵素消化実験を行った。30 °C の恒温槽中で CPDY 溶液と反応させ MALDI-TOF MS ポジティブモードにて反応を時間ごとに追跡した (Figure 3-6)。30 分後、**3-46** ( $m/z$  1277) の C 末端側から Phe、Tyr、Ser が順次切断されたペプチド **3-47** ( $m/z$  1130), **3-48** ( $m/z$  967), **3-49** ( $m/z$  880) の生成が確認された (Figure 3-6, b)。2 時間後には、**3-46** は完全に消失し、ペプチド **3-49** ( $m/z$  880) に収束した (Figure 3-6, c)。その後も追跡を続けたが Sq-アミドが切断されたペプチド **3-50** ( $m/z$  733) に相当するピークは観測されず、それ以上の分解反応は進行しなかった。この結果より、デカペプチド **3-46** の天然型のアミド結合は消化酵素によって C 末端から順次切断されるものの、 $\alpha$ -Asq が形成する Sq-アミド結合は切断をされなかった。この結果、Sq-アミド結合が CPDY に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。



**Figure 3-6.** Enzymatic hydrolysis reaction of peptide **3-46** with carboxypeptidase Y. MALDI-TOF MS spectra of the crude mixture at (a) 0 h, (b) 0.5 h, (c) 2 h. Matrix:  $\alpha$ -CHCA, results recorded in the positive ion mode.

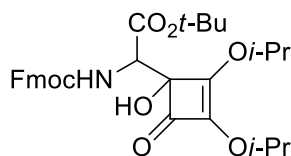
### 第三章まとめ

本章では固相合成における  $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成について述べた。当初 SqGly の固相担持には、Fmoc-SqGly-Oi-Pr **3-5** の使用を計画したが、SqGly からのアミンの生成が困難であることが分かった。この問題はジペプチドユニット **3-18** を用いることで解決され、SqGly の固相担持に成功した。また、SqPhe の固相担持には **3-18** の場合に見られた  $\alpha$  位プロトンの引き抜きによって生じる分解反応のパスを避けるため  $\alpha$  位を四級炭素化したジペプチドユニット **3-34** を用いた。本合成法を用いたペプチドアナログライブラリーの合成により、アミノ酸配列の異なる 162 のペプチドを合成した。これらの生物活性調査によって、やや弱いながらもラット肝がん細胞に対する成長阻害活性を見出した。最後にデカペプチド **3-46** と消化酵素(カルボキシペプチダーゼ Y)との反応を解析した結果、Sq-アミド結合は加水分解酵素に対して抵抗性をもつことを明らかにした。





***tert*-Butyl 2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)acetate (3-11)**



To a solution of **3-10** (6.40 g, 13.8 mmol) in MeOH (28 mL) was added 20% Pd-C (1.28 g) at room temperature. The mixture was stirred under H<sub>2</sub> for 3 h at room temperature, and filtrated through a celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give amine product (4.59 g). The amine was subjected to the next step without purification. FmocOSu (4.65 g, 13.8 mmol) was added to a solution of the amine product (4.59 g) in CH<sub>3</sub>CN (16 ml) at room temperature. The mixture was stirred for 4 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **3-11** (6.19 g, 81% from **3-10**), a 1:2 inseparable mixture as a yellow oil:

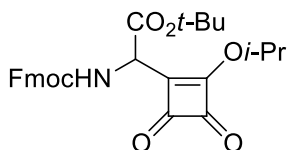
FTIR (neat) 3409, 2979, 2935, 1770, 1729, 1621, 1515, 1452, 1386, 1375, 1321, 1218, 1157, 1099, 1056 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 5.83 (br d, 2/3H), 5.68 (br d, 1/3H), 4.94-4.81 (m, 2H), 4.72 (m, 1H), 4.37 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 4.22 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 1.51 (s, 3H), 1.49 (s, 6H), 1.39-1.23 (m, 12H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 182.1, 181.5, 168.2, 163.6, 163.4, 156.4, 143.7, 141.2, 133.1, 132.7, 127.7, 127.0, 125.2, 119.9, 86.7, 85.7, 84.0, 83.4, 73.9, 67.6, 57.8, 47.0, 27.8, 22.73, 22.68, 22.44, 22.37, 22.22, 22.18;

HRMS (FAB) *m/z* (M+H)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>31</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>8</sub>+H]<sup>+</sup> 552.2592, found 552.2598.

**Fmoc-[α-(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-Oi-Pr (3-12)**



To a solution of **3-11** (702 mg, 1.27 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) was added 12*N* HCl (0.083 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h, quenched with NaHCO<sub>3</sub>, and filtrated through a celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **3-12** (499 mg, 80%) as a yellow oil:

FTIR (neat) 3345, 2983, 2937, 1799, 1727, 1596, 1511, 1450, 1390, 1322, 1249, 1151, 1095, 1052 cm<sup>-1</sup>;

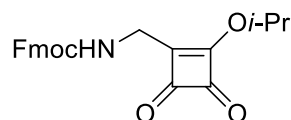
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.76 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.2 Hz,

2H), 7.31 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 6.06 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 5.52-4.40 (m, 2H), 4.37-4.31 (m, 2H), 4.25 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 1.48 (s, 9H), 1.47-1.42 (m, 6H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.5, 193.5, 191.4, 174.5, 165.1, 155.4, 143.6, 141.2, 127.7, 127.0, 125.1, 119.9, 84.7, 80.3, 67.6, 51.4, 46.9, 27.8, 22.7, 22.6;

HRMS (FAB)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{28}\text{H}_{29}\text{NO}_7+\text{H}]^+$  492.2017, found 492.2014.

### Fmoc-SqGly-Oi-Pr (3-5)



To a solution of **3-12** (290 mg, 0.589 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (6 mL) was added TFA (1.4 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. The mixture was quenched with sat.  $\text{NaHCO}_3$  (10 mL) and extracted with EtOAc (5 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **3-5** (175 mg, 76%) as a yellow oil:

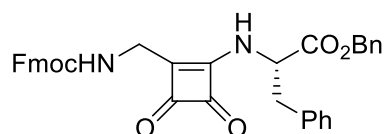
FTIR (neat) 3347, 3066, 3018, 2985, 2938, 1795, 1751, 1714, 1590, 1517, 1450, 1400, 1324, 1243, 1143, 1093, 1049, 1004  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.76 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.59 (d,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.40 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 7.31 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 5.46 (br s, 1H), 5.39 (sept,  $J = 6.3$  Hz, 1H), 4.52-4.39 (m, 4H), 4.23 (t,  $J = 6.6$  Hz, 1H), 1.43 (d,  $J = 6.3$  Hz, 6H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.7, 193.3, 193.0, 177.7, 156.2, 143.6, 141.2, 127.7, 127.0, 125.0, 119.9, 80.0, 67.2, 47.0, 36.5, 22.6;

HRMS (FAB)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_5+\text{H}]^+$  392.1492, found 392.1488.

### Fmoc-SqGly-L-Phe-OBn (3-14)



To a solution of **3-5** (48 mg, 0.123 mmol) in MeOH (1 mL) was added a solution of H-L-Phe-OBn **3-13** (32 mg, 0.125 mmol) in MeOH (0.5 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h and washed with 4N HCl (3 mL). The organic layer was washed with sat.  $\text{NaHCO}_3$  (5 mL) and brine (5 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/1) to give **3-14** (51 mg, 71%) as a pale yellow amorphous solid:

$[\alpha]^{24.8}_{\text{D}}$   $-4.0^\circ$  ( $c$  0.95,  $\text{CHCl}_3$ );

FTIR (neat) 3318, 3029, 2952, 1787, 1739, 1700, 1606, 1517, 1450, 1334, 1251, 1216, 1178, 1106,

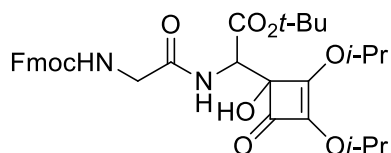
1079, 1052, 1002  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.91 (d,  $J = 8.7$  Hz, 1H), 7.78 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.57 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.41 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.35-7.00 (m, 12H), 5.89 (br s, 1H), 5.22- 5.12 (m, 3H), 4.42 (dd,  $J = 9.6$  Hz, 6.0 Hz, 1H), 4.28-4.15 (m, 2H), 4.12 (d,  $J = 6.0$  Hz, 2H), 3.23 (dd,  $J = 13.8$  Hz, 5.4 Hz, 1H), 3.05 (dd,  $J = 13.8$  Hz, 8.1 Hz, 1H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.7, 190.0, 183.8, 169.9, 166.3, 158.3, 143.6, 143.4, 141.20, 141.17, 134.6, 134.4, 129.3, 128.6, 128.4, 127.8, 127.3, 127.0, 125.1, 124.9, 120.0, 67.7, 67.6, 57.5, 46.8, 39.7, 33.3;

HRMS (FAB)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_6+\text{H}]^+$  587.2177, found 587.2177.

**Fmoc-Gly-[*tert*-butyl 2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)acetate] (3-22)**



To a solution of **3-10** (12.4 g, 26.8 mmol) in MeOH (55 mL) was added 10% Pd-C (2.48 g) at room temperature. The mixture was stirred under  $\text{H}_2$  for 3 h at room temperature and filtrated through a celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give amine product (9.0 g). The amine was subjected to the next step without purification. Fmoc-Gly-OH **3-21** (8.1 g, 27.3 mmol) and EDCI (5.26 g, 27.4 mmol) were successively added to a solution of amine (9.0 g) in THF (78 ml) at 0  $^\circ\text{C}$ . The mixture was stirred for 10 min at 0  $^\circ\text{C}$ , warmed to room temperature, and stirred for 3 h. The mixture was quenched with sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted with EtOAc (20 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/3) to give **3-22** (16.0 g, 98% (2 steps from **3-10**), an inseparable 2:1 mixture of diastereomers) as a yellow amorphous solid:

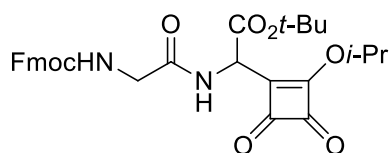
FTIR (neat) 3338, 2981, 2937, 1769, 1727, 1615, 1520, 1450, 1386, 1373, 1320, 1249, 1157, 1097, 1048, 997, 960, 938, 909, 843, 759, 735  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.72 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.59 (br d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.36 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.27 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.19 (br s, 1H), 6.10 (br s, 2/3H), 6.00 (br s, 1/3H), 5.02 (d,  $J = 8.7$  Hz, 2/3H), 4.95 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1/3H), 4.91-4.75 (m, 2H), 4.35 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 4.22 (t,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 4.12-3.91 (m, 2H), 1.51-1.15 (m, 21H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  182.8, 182.3, 170.0, 169.7, 167.6, 167.5, 164.7, 164.6, 156.7, 156.5, 143.8, 143.7, 141.1, 132.2, 127.5, 126.9, 125.1, 119.7, 85.5, 85.4, 83.2, 83.1, 73.8, 73.7, 67.3, 56.9, 56.4, 46.9, 44.3, 27.70, 27.67, 22.63, 22.57, 22.41, 22.35, 22.11, 22.05;

HRMS (FAB)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{H}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{33}\text{H}_{40}\text{N}_2\text{O}_9+\text{H}]^+$  609.2807, found 609.2823.

### Fmoc-Gly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-Oi-Pr (**3-23**)



To a solution of **3-22** (1.40 g, 2.30 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (22 mL) was added 12 *N* HCl (0.18 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h, quenched with NaHCO<sub>3</sub>, and filtrated through a celite pad. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/3) to give **3-23** (876 mg, 70%) as a yellow amorphous solid:

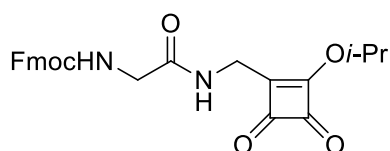
FTIR (neat) 3342, 2981, 1797, 1733, 1682, 1594, 1519, 1450, 1392, 1326, 1251, 1150, 1093, 1047, 910, 761, 734 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.76 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.40 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.22 (br s, 1H), 5.58 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H), 5.53 (br s, 1H), 5.46 (sept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.43 (d, *J* = 6.6 Hz, 2H), 4.24 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.00 (br s, 1H), 1.49-1.44 (m, 15H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  196.5, 193.3, 191.6, 173.7, 169.2, 164.7, 156.5, 143.7, 141.1, 127.5, 126.9, 125.0, 119.8, 84.6, 80.4, 67.2, 49.9, 46.9, 44.0, 27.7, 22.6, 22.5;

HRMS (FAB) *m/z* (M+H)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>30</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>+H]<sup>+</sup> 549.2231, found 549.2234.

### Fmoc-Gly-SqGly-Oi-Pr (**3-18**)



To a solution of **3-23** (1.40 g, 2.55 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (26 mL) was added TFA (6 mL) at 0 °C. The mixture was stirred for 10 min at 0 °C, warmed to room temperature, and stirred for 12 h. The mixture was quenched with sat. NaHCO<sub>3</sub> and extracted with EtOAc (15 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine, dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-1/6) to give **3-18** (780 mg, 69%) as a yellow amorphous solid:

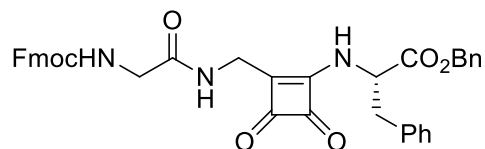
FTIR (neat) 3628, 3338, 2987, 1796, 1748, 1670, 1587, 1449, 1404, 1322, 1251, 1201, 1136, 1093, 1049, 990, 899, 800 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.77 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.29 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 5.33 (sept, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.40-4.25 (m, 4H), 4.20 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.82 (s, 2H), 1.41 (d, *J* = 6.0 Hz, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  198.4, 195.5, 194.3, 178.9, 172.8, 158.9, 145.2, 142.6, 128.9, 128.3, 126.3, 121.1, 81.4, 68.2, 48.3, 44.9, 35.5, 23.0;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>25</sub>H<sub>24</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>+H]<sup>+</sup> 449.1707, found 449.1709

### Fmoc-Gly-SqGly-L-Phe-OBn (3-25)



To a solution of **3-18** (50.7 mg, 0.113 mmol) in MeOH (1 mL) was added a solution of H-L-Phe-OBn (43.0 mg, 0.169 mmol) in MeOH (0.5 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 3 h and quenched with 4N HCl (3 mL). The organic layer was washed with sat. NaHCO<sub>3</sub> and brine (15 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 10/1-1/9) to give **3-25** (46.5 mg, 64%) as a yellow amorphous solid:

$[\alpha]^{30.0}_D$  -23.8° (*c* 1.3, MeOH);

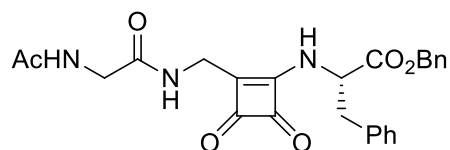
FTIR (neat) 3734, 3709, 3628, 3566, 3289, 1786, 1733, 1607, 1540, 1455, 1244, 1166 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.95 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.74 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.57 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.41-7.00 (m, 15H), 5.68 (br s, 1H), 5.19-5.10 (m, 3H), 4.45 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H), 4.19 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.12 (br s, 2H), 3.78 (br d, 2H), 3.25 (dd, *J* = 13.8, 5.1 Hz, 1H), 3.07 (dd, *J* = 13.8, 8.4 Hz, 1H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 192.4, 190.1, 183.7, 171.8, 170.0, 166.0, 156.7, 143.62, 143.59, 141.3, 134.8, 134.7, 129.4, 128.6, 128.5, 127.7, 127.3, 127.0, 124.9, 120.0, 67.7, 67.0, 57.8, 47.1, 44.3, 39.4, 32.5;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>38</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>+H]<sup>+</sup> 644.2391, found 644.2398.

### Ac-Gly-SqGly-L-Phe-OBn (3-27)



A solution of **3-25** (34.0 mg, 0.053 mmol) in 20% Et<sub>2</sub>NH/THF (1 mL) was stirred for 30 min at room temperature. The mixture was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in THF (1 mL) and added acetic anhydride (1 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 1 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 1/1 and EtOAc/MeOH = 40/1) to give **3-27** (17.5 mg, 72%) as a yellow oil:

$[\alpha]^{30.0}_D$  -31.9° (*c* 1.36, MeOH);

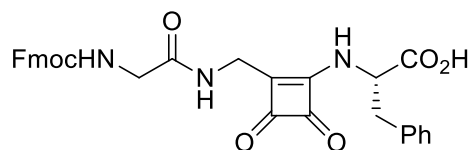
FTIR (neat) 3733, 3628, 3595, 3301, 2980, 2934, 1741, 1653, 1616, 1455, 1271, 1213, 1105, 1050, 753 cm<sup>-1</sup>;

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.96 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.66 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H), 7.37-7.08 (m, 10H), 6.57 (t,  $J = 5.4$  Hz, 1H), 5.24-5.08 (m, 3H), 4.19 (dd,  $J = 15.9, 5.7$  Hz, 1H), 4.19 (dd,  $J = 15.9, 5.7$  Hz, 1H), 3.91 (dd,  $J = 16.5, 5.4$  Hz, 1H), 3.82 (dd,  $J = 16.5, 5.4$  Hz, 1H), 3.28 (dd,  $J = 14.1, 5.1$  Hz, 1H), 3.09 (dd,  $J = 14.1, 9.0$  Hz, 1H), 2.00 (s, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.4, 190.1, 183.7, 171.6, 171.3, 170.2, 166.1, 134.9, 134.7, 129.5, 128.70, 128.67, 128.5, 127.4, 67.8, 57.8, 43.2, 39.5, 32.6, 22.9;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H) $^-$  calcd for  $[\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6\text{-H}]^-$ , 462.1671, found 462.1660.

### Fmoc-Gly-SqGly-L-Phe-OH (**3-29**)



To a suspension of Fmoc-Phe-Wang resin **3-28** (Watanabe Chemical Industries, Ltd., 0.67 mmol/resin(g), 68 mg, 0.046 mmol) in a small reaction tube with a membrane filter (LibraTube, HiPep Lab. Inc.) was added a solution of piperidine/DMF 1:4 (2 mL). The mixture was shaken with a vortex mixer for 1 min. The tube was equipped with a rotary shaker and mixing was continued for 15 min. The solution was removed by filtration and the resin was washed with DMF (2 mL x 3) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL x 2). To a suspension of the residual resin in AcOEt (2 mL), Fmoc-Gly-SqGly-Oi-Pr **3-18** (41 mg, 0.091 mmol) was added. The mixture was shaken with a vortex mixer for 1 min and subjected to mixing with a rotary shaker for 24 h. The mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL x 2). This coupling procedure was repeated once again. The residual resin was moved to a test tube and treated with TFA (3 mL) for 3 h. The mixture was filtrated and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc (1% AcOH) = 2/1-0/1) to give **3-29** (20 mg, 80%, a 4:1 mixture of two rotamers) as a white amorphous solid:

$[\alpha]^{27.5}_{\text{D}} -13.0^\circ$  (*c* 1.32, MeOH);

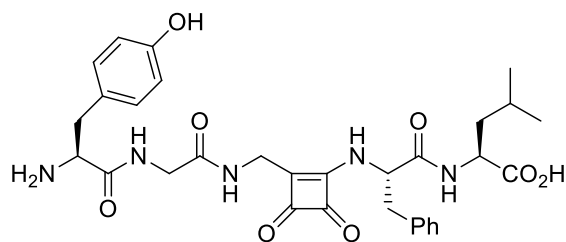
FTIR (neat) 3322, 3019, 2935, 1787, 1722, 1671, 1602, 1531, 1448, 1342, 1247, 1176, 1105, 1045, 993, 755, 701  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.78 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.65 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.38 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.34-7.12 (m, 7H), 5.05 (dd,  $J = 9.9, 4.2$  Hz, 4/5H), 4.62 (dd,  $J = 9.6, 4.2$  Hz, 1/5H), 4.40 (d,  $J = 6.9$  Hz, 8/5H), 4.36 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2/5H), 4.27-3.95 (m, 3H), 3.90-3.64 (m, 2H), 3.36 (m, 1H), 3.08 (m, 1H);

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  192.9, 192.3, 184.7, 173.3, 173.2, 166.7, 159.3, 145.2, 142.6, 137.8, 137.6, 130.7, 130.5, 129.7, 129.6, 128.8, 128.2, 128.14, 128.06, 126.2, 120.9, 68.2, 61.0, 59.6, 48.3, 45.0, 44.8, 39.9, 39.2, 34.6, 34.3;

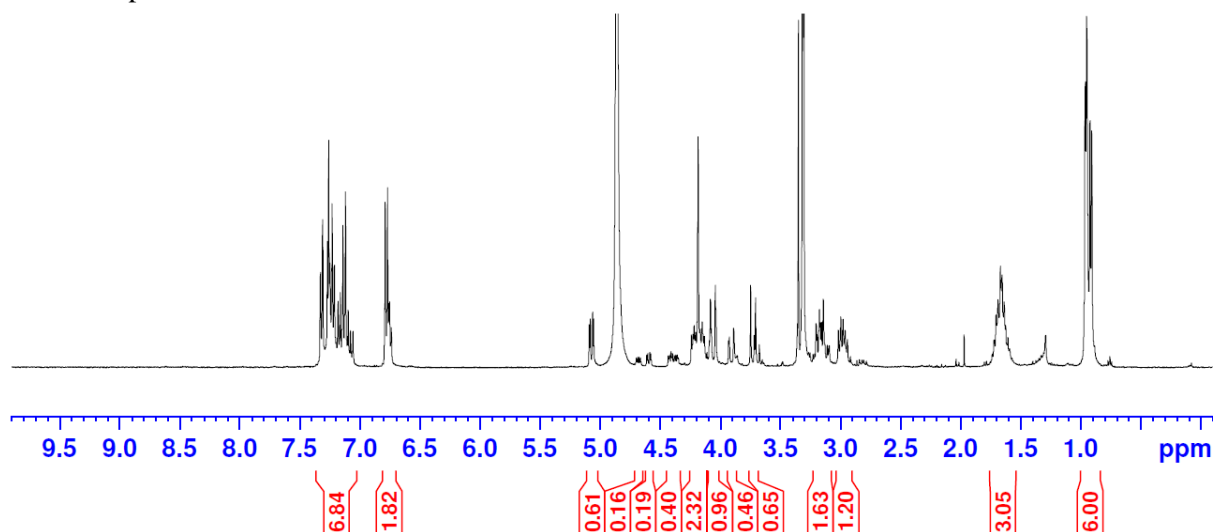
HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H) $^-$  calcd for  $[\text{C}_{31}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_7\text{-H}]^-$  552.1776, found 552.1777.

### Solid phase synthesis of [SqGly<sup>3</sup>] Enkephalin (**3-31**)

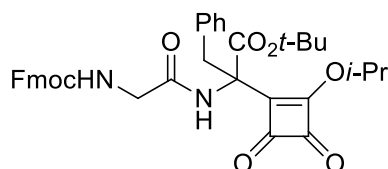


To a suspension of Fmoc-Leu-Wang resin **3-30** (Watanabe Chemical Industries, Ltd., 0.60 mmol/resin(g), 167 mg, 0.10 mmol) in a reaction tube with a membrane filter (LibraTube, HiPep Lab. Inc.) was added a solution of piperidine/DMF 1:4 (2 mL). The reaction tube was vigorously shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 15 min, the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2). Fmoc-Phe-OH, HBTU, HOBt, and DIEA (0.4 mmol, 0.36 mmol, 0.4 mmol, and 0.8 mmol) were added to a suspension of the residual resin in DMF (2 mL). The reaction tube was shaken with a vortex mixer for 2 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 1.5 h, the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2). The subsequent removal of the Fmoc group was carried out using piperidine/DMF 1:4 (2 mL). **3-18** (90 mg, 0.20 mmol) was added to a suspension of the residual resin in AcOEt (2 mL). The reaction tube was vigorously shaken with a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 24 h, the mixture was filtrated and washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2). This coupling procedure was repeated once again. The subsequent removal of the Fmoc group was carried out using Et<sub>2</sub>NH/DMF 1:4 (2 mL) (In the case of using piperidine/DMF, a byproduct which piperidine added to carbonyl group of  $\alpha$ -Asq in desired peptide observed by MALDI-TOF MS analysis after cleavage reaction from the resin.). According to the methods described above, a coupling reaction of Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH was carried out. After the removal of the Fmoc group using Et<sub>2</sub>NH/DMF, the residual resin was moved to a test tube and treated with TFA (3 mL) for 3 h. The mixture was filtrated and concentrated *in vacuo*. The crude mixture was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> (H<sub>2</sub>O/MeOH = 5/1-1/1) to give **3-31** (11 mg, 18%) as a yellow powder. <sup>1</sup>H NMR data of **3-31** was identified with the previous data in the case of synthesis in solution-phase (*Tetrahedron lett.* **2007**, *48*, 7614.):

$^1\text{H}$  NMR spectrum of **3-31** in  $\text{CD}_3\text{OD}$ .



**Fmoc-Gly-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqPhe]-*Oi*-Pr (3-34)**



To a solution of **3-23** (1.70 g, 3.10 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) were added  $\text{BnBr}$  (2.95 mL, 24.8 mmol) and TBAI (9.15 g, 24.8 mmol) at room temperature.  $\text{Et}_3\text{N}$  (0.517 mL, 3.72 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred for 20 min and concentrated *in vacuo*. The resulting residue was filtrated through a celite pad using  $\text{EtOAc}$ . The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/ $\text{EtOAc}$  = 10/1-1/1) to give **3-34** (1.75 g, 90%) as a pale yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3387, 3010, 2982, 2936, 1794, 1758, 1734, 1680, 1591, 1496, 1450, 1389, 1371, 1343, 1330, 1250, 1220, 1150, 1095, 1047, 1006  $\text{cm}^{-1}$ ;

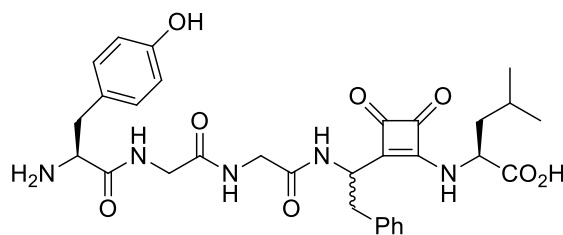
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ),  $\delta$  7.77 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.59 (dd,  $J$  = 7.6, 4.1 Hz, 2H), 7.40 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.30 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.28-7.18 (m, 3H), 7.09 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 2H), 6.98 (s, 1H), 5.50 (sept,  $J$  = 6.4 Hz, 1H), 5.40 (br s, 1H), 4.39 (m, 2H), 4.22 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 1H), 3.93 (m, 2H), 3.90 (d,  $J$  = 13.9 Hz, 1H), 3.63 (d,  $J$  = 13.9 Hz, 1H), 1.50-1.44 (m, 12H), 1.43 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  195.7, 193.6, 191.1, 178.0, 168.3, 166.3, 156.3, 143.7, 141.2, 133.9, 130.0, 128.4, 127.7, 127.6, 127.0, 125.1, 119.9, 85.3, 80.3, 67.3, 63.3, 47.0, 44.3, 37.8, 27.8, 22.8, 22.7;

HRMS (FAB)  $m/z$  (M-H) $^-$  calcd for  $[\text{C}_{37}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_8\text{-H}]^-$  637.2555, found 637.2565.

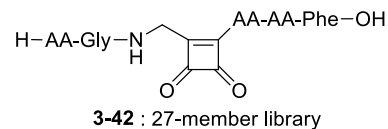
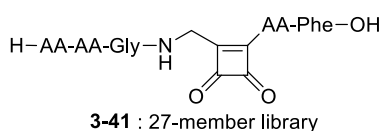
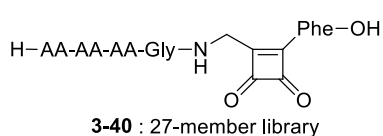


### Solid phase synthesis of [SqPhe<sup>4</sup>] Enkephalin (3-39)



To a suspension of Fmoc-Leu-Wang resin **3-30** (0.60 mmol/resin(g), 167 mg, 0.10 mmol) in a reaction tube with a membrane filter (LibraTube, HiPep Lab. Inc.) was added a solution of piperidine/DMF 1:4 (2 mL). The reaction tube was vigorously shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 15 min, the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2). **3-34** (255 mg, 0.40 mmol) and DIEA (35 μL, 0.20 mmol) were added to a suspension of the residual resin in AcOEt (2 mL). The reaction tube was vigorously shaken with a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 60 h, the mixture was filtrated and washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2). The subsequent removal of the Fmoc group was carried out using Et<sub>2</sub>NH/DMF 1:4 (2 mL). Fmoc-Gly-OH, HBTU, HOBt, and DIEA (0.4 mmol, 0.36 mmol, 0.4 mmol, and 0.8 mmol) were added to a suspension of the residual resin in DMF (2 mL). The reaction tube was shaken with a vortex mixer for 2 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 1.5 h, the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2). According to the methods described above, the subsequent removal of the Fmoc group using Et<sub>2</sub>NH/DMF 1:4 (2 mL) and coupling reaction of Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH were carried out. After the removal of the Fmoc group, the residual resin was moved to a test tube and treated with TFA (3 mL) for 3 h. The mixture was filtrated and concentrated *in vacuo*. The crude mixture (36 mg) was purified by flash column chromatography on Cosmosil<sup>®</sup> (H<sub>2</sub>O/MeOH = 2/1-1/1) to give **3-39** (18 mg, 30%, as 5:4 mixture of two diastereomaers) as a yellow powder:

### Solid phase synthesis of peptide libraries 3-40 ~ 3-42.



AA = Phe, Tyr, HIs

Coupling reactions were performed by a series of sequential transformations.

**3-40**: (a), (b), (c), (d), (c), (d), (c), (d), (c), (e)

**3-41**: (a), (d), (a), (b), (c), (d), (c), (d), (c), (e)

**3-42**: (a), (d), (a), (d), (a), (b), (c), (d), (c), (e)

The solid phase synthesis of libraries **3-40** ~ **3-42** was performed in a small reaction tube with a membrane filter (LibraTube, HiPep Lab. Inc.) using Fmoc-Phe-Wang resin (Watanabe Chemical Industries, Ltd., 0.67 mmol/resin(g), 68 mg, 0.046 mmol).

(a) Removal of the Fmoc group from peptides not containing the  $\alpha$ -Asq

The resin was treated with piperidine/DMF 1:4 (2 mL). The reaction tube was shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 15 min. the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL x 2).

(b) Linkage of Fmoc-Gly-SqGly-Oi-Pr **3-18**

To a suspension of the  $\text{NH}_2$  group-free peptide linked to the resin in AcOEt (2 mL) was added **3-18** (41 mg, 0.091 mmol). The reaction tube was shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 24 h, the mixture was filtered. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL x 2). This procedure was repeated once again.

(c) Removal of the Fmoc group from peptides containing the  $\alpha$ -Asq

The resin was treated with  $\text{Et}_2\text{NH}$ /DMF 1:4 (2 mL). The reaction tube was shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 15 min, the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL x 2).

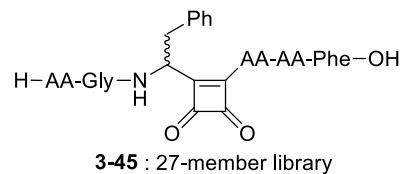
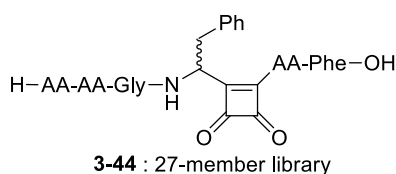
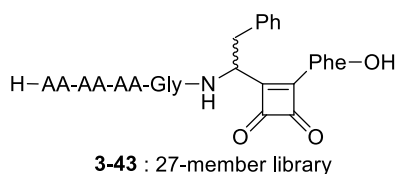
(d) Coupling reaction of Fmoc-amino acids

To a suspension of the residual resin in DMF (2 mL) was added a mixture of amino acids (Fmoc-Phe-OH/Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH/Fmoc-His(Trt)-OH: 0.60 mmol each), HBTU (1.64 mmol), HOBT (1.82 mmol), and DIEA (3.64 mmol). The reaction tube was shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 1.5 h, the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 mL x 2).

(e) Cleavage of the peptide from resin

The residual resin was moved to a test tube and treated with TFA/ $\text{H}_2\text{O}$  19:1 (3 mL) for 3 h. The mixture was filtrated. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give a crude mixture (38 mg).

**Solid phase synthesis of peptide libraries 3-43 ~ 3-45.**



Coupling reactions were performed by a series of sequential transformations.

**3-43:** (a), (b), (c), (d), (c), (d), (c), (d), (c), (e)

**3-44:** (a), (d), (a), (b), (c), (d), (c), (d), (c), (e)

**3-45:** (a), (d), (a), (d), (a), (b), (c), (d), (c), (e)

The solid phase synthesis of libraries **3-43** ~ **3-45** was performed in a small reaction tube with a membrane filter (LibraTube, HiPep Lab. Inc.) using Fmoc-Phe-Wang resin (Watanabe Chemical Industries, Ltd., 0.67 mmol/resin(g), 150 mg, 0.10 mmol).

(a) Removal of the Fmoc group from peptides not containing the  $\alpha$ -Asq

The resin was treated with piperidine/DMF 1:4 (2 mL). The reaction tube was shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 15 min. the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 5) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2).

(b) Linkage of dipeptide unit **3-34**

To a suspension of the NH<sub>2</sub> group-free peptide linked to the resin in AcOEt (2 mL) were added **3-34** (116 mg, 0.40 mmol) and DIEA (35  $\mu$ L, 0.20 mmol). The reaction tube was shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 60 h, the mixture was filtered. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2).

(c) Removal of the Fmoc group from peptides containing the  $\alpha$ -Asq

The resin was treated with Et<sub>2</sub>NH/DMF 1:4 (2 mL). The reaction tube was shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 15 min, the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2).

(d) Coupling reaction of Fmoc-amino acids

To a suspension of the residual resin in DMF (2 mL) was added a mixture of amino acids [Fmoc-Phe-OH/Fmoc-Tyr(*t*-Bu)-OH/Fmoc-His(Trt)-OH (1.33 mmol each)], HBTU (3.6 mmol), HOBt (4 mmol), and DIEA (8 mmol). The reaction tube was shaken by a vortex mixer for 1 min and equipped with a rotary shaker. After mixing for 1.5 h, the mixture was filtrated. The residual resin was washed with DMF (2 mL x 3) and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL x 2).

(e) Cleavage of the peptide from resin

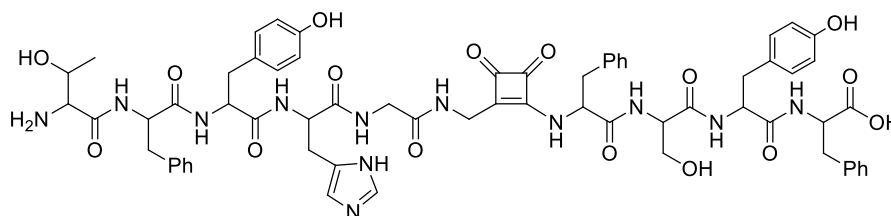
The residual resin was moved to a test tube and treated with TFA/H<sub>2</sub>O 19:1 (3 mL) for 3 h. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give a crude mixture (ca. 105 mg).

#### **Cell proliferation assay of the rat hepatoma cells (dRLh-84)**

According to the modified method of a previous paper (Yang et al., 2007),<sup>3)</sup> the cultures of rat hepatoma cells (dRLh-84) were maintained at 37 °C in humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. Exponentially growing cells were trypsinized, seeded at an appropriate density, and incubated for 24 h to allow adhesion and growth. Trypsinized cells were suspended in the culture medium at a density of 5 x 10<sup>4</sup> cells/mL and 100  $\mu$ L of the suspension was dispensed into each well of a 96-well microtiter plate. In a 24 h pre-incubation, DMSO used as a control or peptides for assays were added to culture

medium of cells. After subsequent 48 h incubation, cells were trypsinized and determined by means of counting in Burker-Turk hemacytometer. Results were expressed as means±S.E. of three independent experiments.

### Synthesis of decapeptide 3-46.



In according to the method for the solid phase synthesis of **3-31**, the model peptide **3-46** was prepared starting from the resin (0.05 mmol) by the following coupling sequence.

### Proteolytic degradation study

#### *Purification of decapeptide 3-46.*

10  $\mu\text{L}$  of a solution of the crude peptide in  $\text{H}_2\text{O}$  (24 mg/mL) was subjected to reverse phase HPLC several times [column: Nacalai Cosmosil Packed Column Cholester, 4.6 x 250 mm, elute: 25% MeCN (0.1% TFA)/ $\text{H}_2\text{O}$  (0.1% TFA) 1 mL/min, detect: UV 254 nm, retention time: 26.5 min). After lyophilization, peptide analog **3-46** (< 0.1 mg) was obtained.

#### *Reaction of 3-46 with carboxypeptidase Y.*

Peptide **3-46** was dissolved in water (15  $\mu\text{L}$ ). A buffer solution of carboxypeptidase Y (5  $\mu\text{L}$ , 2.5 mM / 50 mM ammonium bicarbonate) was added to a solution 5  $\mu\text{L}$  of peptide solution in an eppendorf-tube. The reaction mixture was incubated at 30  $^\circ\text{C}$  for 30 min. The time course of the reaction was monitored by MALDI-TOF/MS.

### References for Chapter 3

- 1) Melnyk, O.; Ollivier, N.; Besret, S.; Melnyk, P. *Bioconjugate Chem.* **2014**, *25*, 629; (b) Kiss, L.; Fülöp, F. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1116; (c) Ishibashi, Y.; Kitamura, M.; *Chem. Commun.* **2009**, *45*, 6985; (d) Cudic, P.; Stawikowski, M. Peptidomimetics: Fmoc Solid-Phase Pseudopeptide Synthesis; In *Peptide-Based Drug Design*, Otvos, L. ed.; Humana Press, **2008**, 223; (e) Angelo, N. G.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 17134.
- 2) Gongora-Benitez, M.; Tulla-Puche, J.; Albericio, F. *ACS Combinatorial Science*, **2013**, *15*, 217; (b) *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis, Vol. 4*, A. B. Hughes, ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2011**; (c) *Peptides: Chemistry and Biology*, 2nd Ed., N. Sewald and H.-D. Jakubke, eds.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, **2009**.
- 3) Yang, P.; Abe, S.; Sato, Y.; Yamashita, T.; Mtsuda, F.; Hamayasu, T.; Imai, K.; Suzuki, K. *J. Insect Biotech. Sericol.* **2007**, *76*, 63.
- 4) (a) Hayashi, R., Aibara, S. Hata, T. *Biochini. Biophys. Actu.* **1970**, *212*, 359. (b) Stennicke, H. R.; Mortensen, U. H.; Breddam, K. *Biochemistry* **1996**, *35*, 7131.

#### 第四章 $\alpha$ -Asq を利用した Caspase-3 阻害剤の開発

第二章において確立した  $\alpha$ -Asq 含有ペプチドアナログの合成法を用いて、 $\alpha$ -Asq を組み込んだ生理活性ペプチドの開発に着手した。筆者は、Sq 基の高い求電子性に着目して、システインプロテアーゼの酵素活性中心のチオールに作用する阻害剤として、 $\alpha$ -Asq を利用できる考えた。本章では、アポトーシスのシグナル伝達に密接に関わり、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の治療ターゲットとして注目される Caspase-3 の阻害剤の開発について述べる。

#### Caspase

Caspase は一群のシステインプロテアーゼであり、標的タンパク質の Asp 残基の C 末端を切断する活性をもつ (Figure 4-1)。<sup>1)</sup> これまでに哺乳動物から 14 種類 (その内ヒトからは 11 種類) が同定されている。Caspase はその役割により Group 1~3 の 3 つのグループに分けられる (Table 4-1)。Group 1 はサイトカインの活性化を通じて、炎症を誘導する役割を担う。Group 2 と Group 3 はアポトーシスのシグナル伝達に関与している。Group 2 は Effector caspase と呼ばれ、細胞核内に存在するアポトーシスに関わるタンパク質群を分解し、細胞をアポトーシスへと導く。Group 3 は Initiator caspase と呼ばれ、Effector caspase の活性化を担う。Caspase は S1~S4 の酵素ポケットを有し、基質となるタンパク質のテトラペプチド骨格を認識に要求する。それぞれの役割によって、効率良く認識するタンパク質のアミノ酸配列が異なる。<sup>2)</sup>

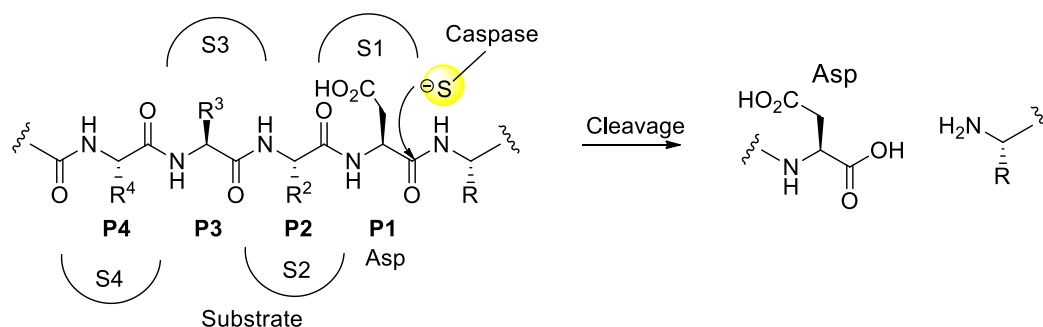


Figure 4-1.

Table 4-1.

	Caspases	Function	Optimized recognition sequence (P4-P3-P2-P1)
Group 1	Caspase-1, 4, 5	Inflammation	Trp/His-Glu-His-Asp
Group 2	Caspase-3, 6, 7	Apoptosis (Effector)	Asp-Glu-Val-Asp
Group 3	Caspase-2, 8, 9, 10	Apoptosis (Initiator)	Leu/Val-Glu-Xaa-Asp

## アポトーシス

アポトーシスは多細胞生物における細胞の死に方の一種で、個体をより良い状態に保つために積極的に引き起こされるプログラム化された細胞死である。生体防御機構として、劣化、癌化、ウイルス感染した細胞を細胞死へと追いやり、あらゆる疾患の進行を未然に防ぐ。その一方で、アポトーシスの過剰な働きは神経変性疾患やエイズ、虚血性疾患などに繋がる恐れがある。例えば、神経変性疾患に見られる神経細胞の消滅には、このアポトーシスが関わっていると考えられる。<sup>3)</sup> そのためアポトーシス実行因子である Caspase は、これらの疾患の治療ターゲットとしてみなされている。

## Caspase カスケード

アポトーシスは Caspase カスケードと呼ばれる Caspase が順に活性化されていく一連のシグナル伝達によって誘導される(Figure 4-2)。<sup>4)</sup> Caspase はもともと不活性な Procaspase として生産されている。<sup>1, 5)</sup> これがアポトーシスを誘導する刺激によって Initiator caspase が活性化されることで Caspase カスケードが開始される。アポトーシスを誘導する主要なシグナル伝達経路には、細胞外のデスリガンドからの経路と、細胞内のミトコンドリアからの経路がある。細胞膜上には Fas と呼ばれるデス受容体が存在し、これに細胞外のデスリガンドが結合すると、細胞内に存在するアダプター分子 (FADD) を介して Caspase-8 を活性化する。活性化された Caspase-8 がさらに下流にある Caspase-3 を活性化することでアポトーシスへと誘導する。一方、細胞内のミトコンドリアからの経路は、細胞内の DNA 損傷や低酸素症などの刺激によりミトコンドリアからのシトクロム c が漏出することで始まる。このシトクロム c が細胞内のタンパク質 Apaf-1 および Caspase-9 との間でアポトソームと呼ばれる集合体を形成する。これにより Caspase-9 が活性化され、下流の Caspase-3 を活性化してアポトーシスへと誘導する。

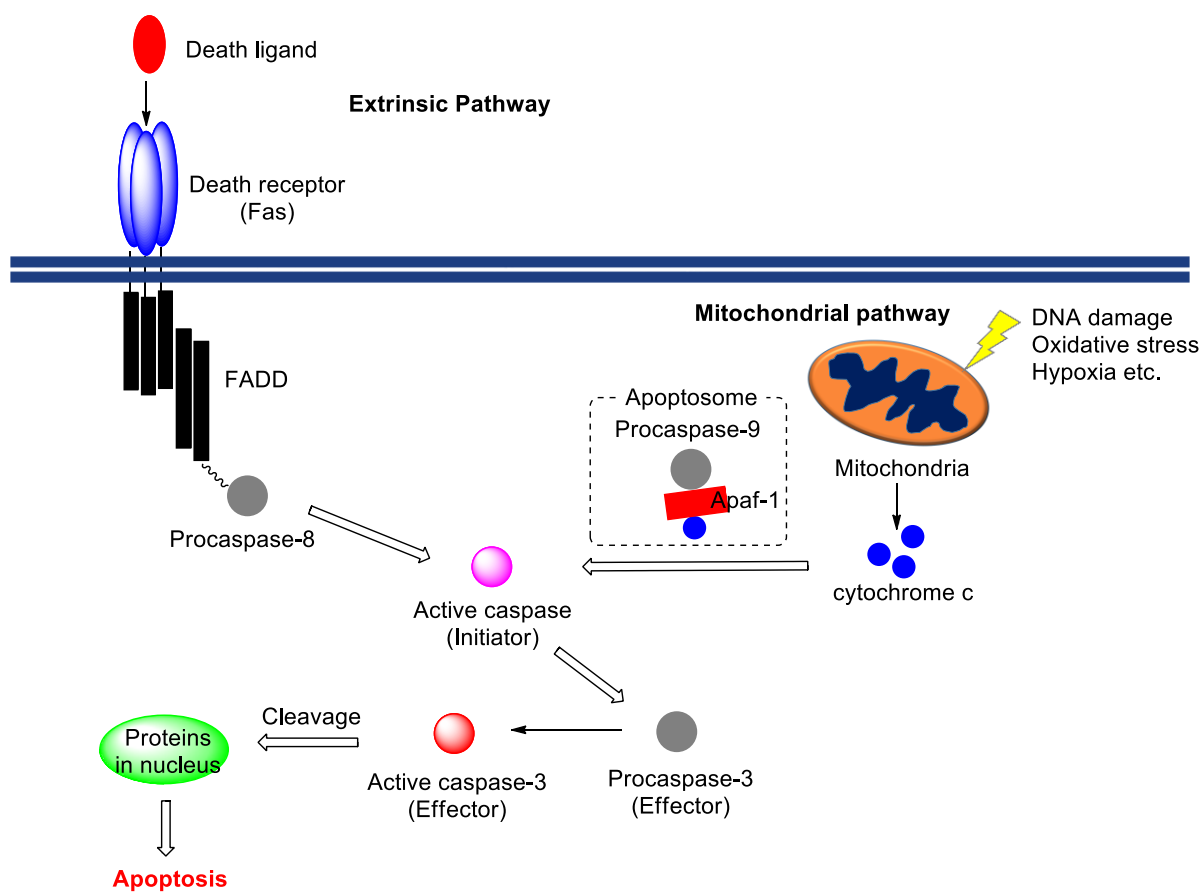
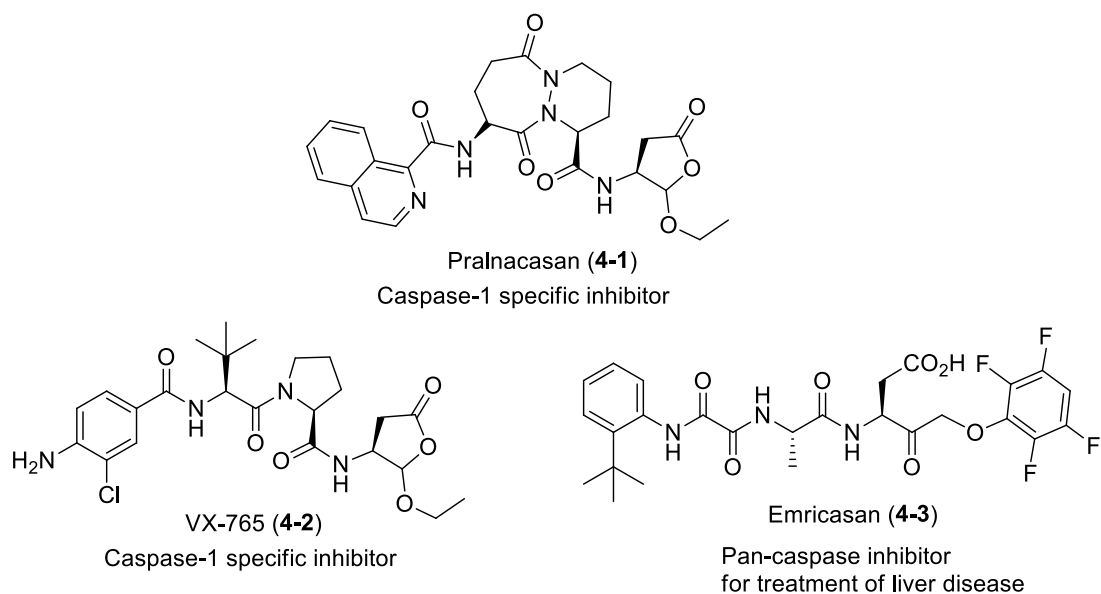


Figure 4-2. Caspase cascade.

#### 4-1. Caspase 阻害剤

アポトーシスや炎症誘導のシグナル伝達を制御し、それらが原因でもたらされる疾患の治療薬の開発に向けた Caspase 阻害剤の研究が世界中で行われている。Pralnacasan (4-1)<sup>6)</sup> および VX-765 (4-2)<sup>7)</sup> は Caspase-1 の選択的阻害剤として開発され、リュウマチや骨関節炎等の炎症性の疾患治療薬として臨床試験がなされたが、現在は中止されている(Figure 4-3)。また Emricasan (4-3)<sup>8)</sup> はすべての Caspase に対する阻害剤であり、門脈圧亢進症および非アルコール性脂肪性肝疾患に対する Phase 2 開発中である。これまでに、Caspase 阻害剤が医薬品として上市されているものはない。そのため、阻害剤として利用できる新規なビルディングブロックの開発や薬剤レパートリーの拡大が求められている。著者は、上述の主要な Caspase カスケードにおいて最も下流に存在する Caspase-3 をターゲットとした阻害剤の開発に取り組んだ。

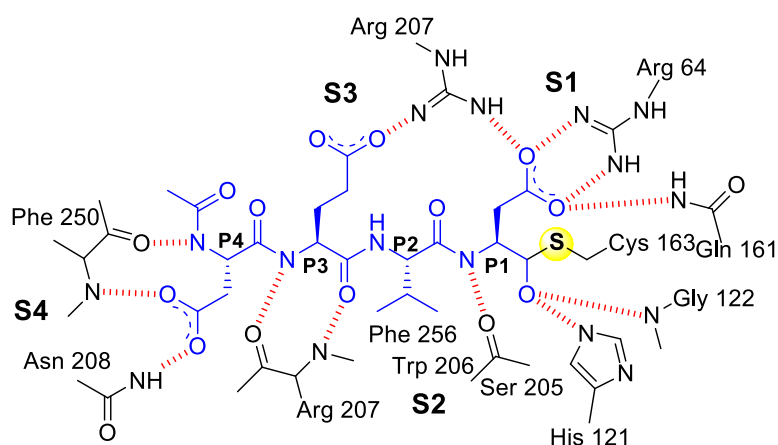




**Figure 4-3.** Caspase inhibitors.

#### Caspase -3 の基質認識

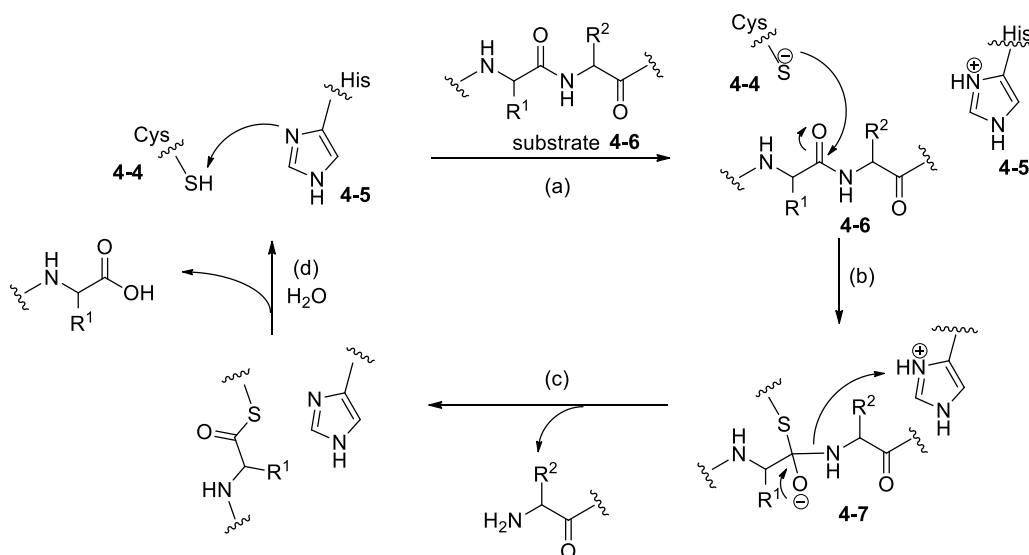
プロテアーゼ阻害剤の分子設計は、プロテアーゼが認識するタンパク質基質のアミノ酸配列を基にして行う substrate-based drug design と呼ばれる手法が主流である。ターゲットとする Caspase-3 は P4-P3-P2-P1 = Asp-Glu-Val-Asp のアミノ酸配列を最も効率よく認識する。<sup>2)</sup> Caspase-3 とペプチドアルデヒド(Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO) の結合様式を Figure 4-4 に示した。<sup>9)</sup> 全ての Caspase に共通して基質の切断箇所である P1 部には Asp が要求される。これは、Caspase の S1 ポケットには Arg 64, Arg 207 および Gln 161 が存在し、基質の Asp 側鎖のカルボキシレートと強く相互作用するためである。Caspase-3 の S2 ポケットには Phe 256 や Trp 206 が存在する。そのため、基質の P2 には、これらと疎水結合を形成する Val が最適である。基質の P3 には Glu が最適であり、Glu 側鎖のカルボキシレートと S3 ポケットの Arg 207 のグアニジノ窒素が水素結合を形成している。P4 には Phe 250 のアミノ基および Asn 208 の側鎖の一级アミドとイオン相互作用を及ぼす Asp が最適である。これにより、Caspase-3 の阻害剤は、Asp-Glu-Val-Asp のテトラペプチド骨格を基にして開発される。



**Figure 4-4.** Binding interactions of Ac-DEVD-CHO in caspase-3 active site.

### タンパク質分解のメカニズム

次にシステインプロテアーゼのタンパク質分解メカニズムについて記した(Scheme 4-1)。<sup>10)</sup> まず、(a) 酵素活性中心のシステイン **4-4** のチオールが隣接するヒスチジン **4-5** などの塩基性アミノ酸により脱プロトン化を受ける。続いて、(b) 活性化されたシステインのチオールが基質 **4-6** のアミドに求核付加しテトラヘドラルな遷移状態 **4-7** を形成し、(c) アミノ基の脱離を伴ってアミド結合を切断する。最後に (d) チオエステルが加水分解を受けて、酵素は元の状態に戻る。

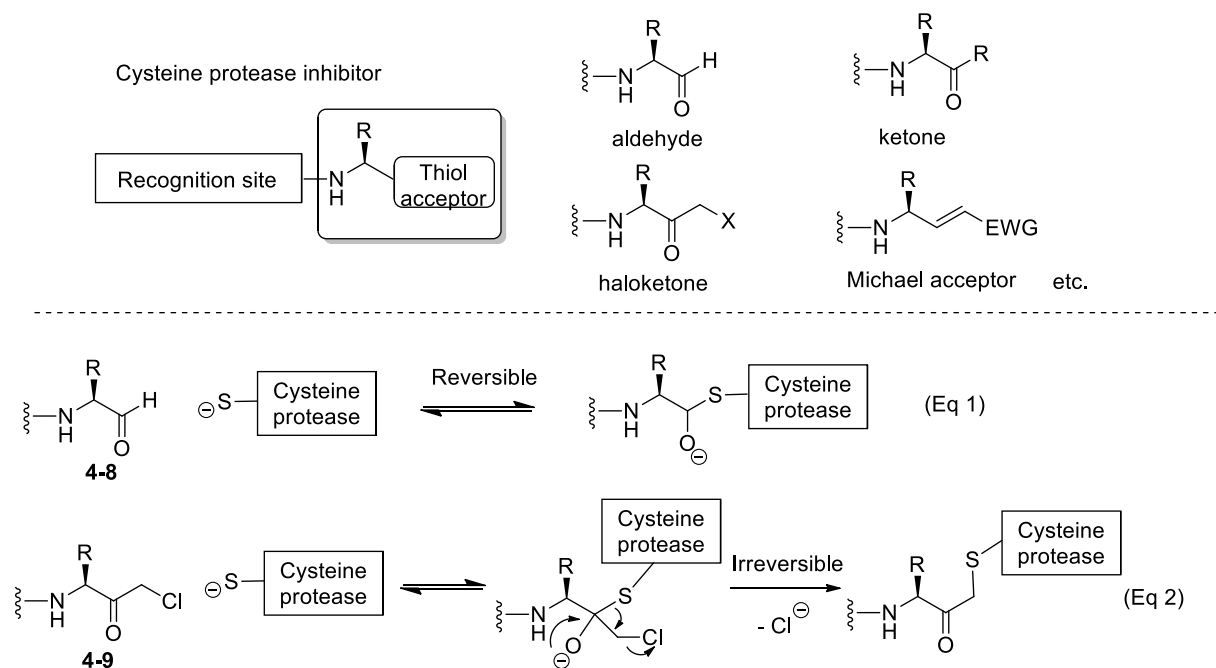


**Scheme 4-1.** Mechanism for substrate cleavage by cysteine protease.

### システインプロテアーゼ阻害剤の分子設計

上記の加水分解メカニズムに基づいて、システインプロテアーゼ阻害剤は、認識アミノ酸配列の C 末端のカルボキシル基を活性中心のチオール基と反応しうる官能基に置き換えることで開発される (Figure 4-5)。例えばチオールアクセプターとなりうるアルデヒド、ケトン構

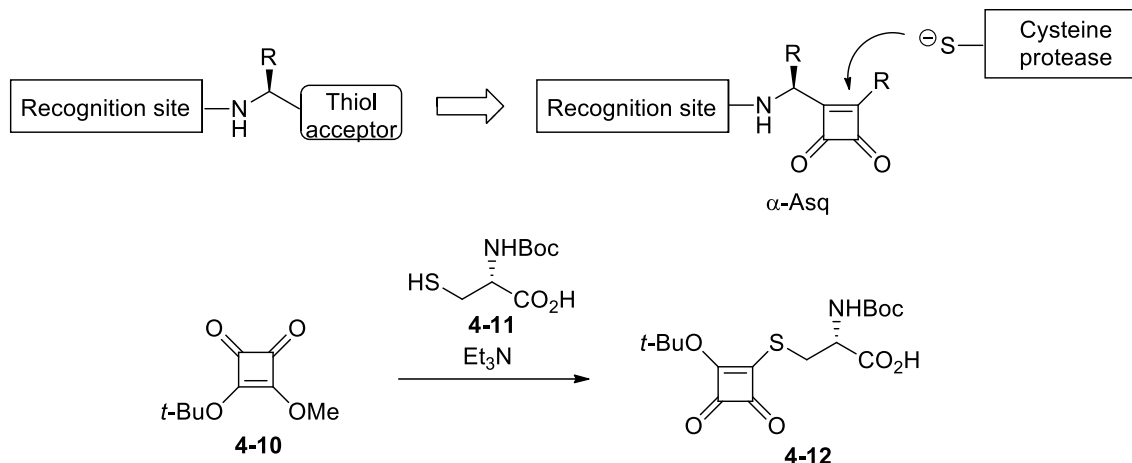
造やマイケルアクセプター構造などが認識アミノ酸配列を有するペプチドの C 末端に組み込まれる。これにより、競合的にシステインプロテアーゼの酵素ポケットに入り込み、酵素活性中心のシステイン残基のチオールを共有結合を介して捕捉することで阻害が進行する。これらの阻害剤はその官能基の性質により、プロテアーゼを可逆的もしくは不可逆的に阻害する。例えば、アルデヒド体 **4-8** はチオールと可逆的な共有結合を形成する可逆阻害剤であり (Eq 1)、一方でクロロメチルケトン体 **4-9** は、クロロ基の脱離を伴って酵素活性中心のチオールと不可逆的な共有結合を形成する不可逆阻害剤であることが知られている (Eq 2)。<sup>11)</sup>



**Figure 4-5.** General structure and inhibition mechanism of cysteine protease inhibitor.

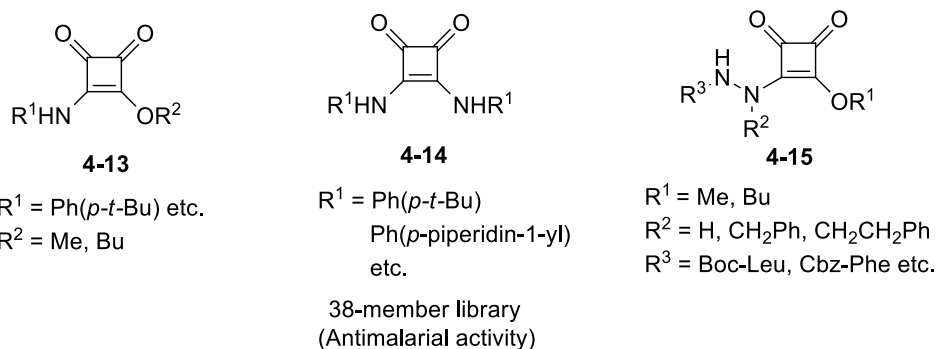
#### 4-2. $\alpha$ -Sq 含有 Caspase-3 阻害剤の合成

筆者の所属する研究室では、硫黄を介して Sq 基を連結したグルタミン酸アナログの合成研究において、SqA ジエステル **4-10** と Boc-Cys-OH **4-11** が容易に反応し、1,4-付加脱離生成物 **4-12** を与えることを明らかにしている (Scheme 4-2)。<sup>12)</sup> 前節で述べた阻害剤の分子設計を参考に、システインプロテアーゼ阻害剤のチオールアクセプターとして、チオール類と高い反応性を示す Sq 基が利用できるのではないかと考えた。



**Scheme 4-2.**

SqA を用いたシステインプロテアーゼ阻害剤の研究は、2012 年に Santos らによって報告されている (Figure 4-6)。<sup>13)</sup> この研究グループではシステインプロテアーゼの阻害剤として、スクアリン酸を用いた 38 つの化合物 **4-13** ~ **4-15** の合成が行われた。これらのシステインプロテアーゼであるパピインやマラリア原虫由来のファルシパイン-2 に対する阻害活性およびヒト赤血球における抗マラリア活性を評価した。その結果、 $\mu$ M レベルでの抗マラリア活性を有するものをいくつか見出している。しかし、**4-13** および **4-14** はパピインとファルシパイン-2 に対するシステインプロテアーゼ阻害剤としての働きが認められた一方で、ペプチド性の **4-15** はそれらに対する阻害活性はなかった。**4-15** の抗マラリア活性はマラリア原虫のライフサイクルに関わる別のプロテアーゼを阻害しているのかもしれないと考察されている。

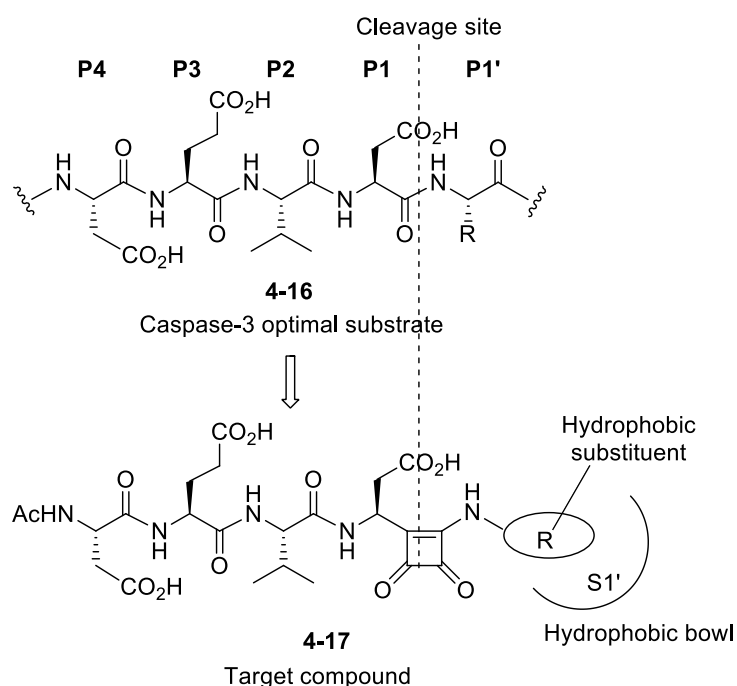


**Figure 4-6.** SqA derivatives as antimalarial compounds.

#### $\alpha$ -Asq を導入した Caspase-3 阻害剤の分子設計

Caspase-3 の阻害剤として、認識アミノ酸配列(-Asp-Glu-Val-Asp-) **4-16** の P1 部の Asp 残基を SqAsp に置換したテトラペプチドアナログ **4-17** を設計した (Figure 4-7)。**4-17** の Sq 基が、Caspase-3 の酵素活性中心のチオールと共有結合を介して結合し、Caspase-3 の酵素活性を阻害できると考えられる。また、 $\alpha$ -Asq の高い反応性を利用すれば、**4-17** の C 末端 (P1') にヘテロ原子を介して種々の置換基を導入することが可能である。Zamboni らの研究によれ

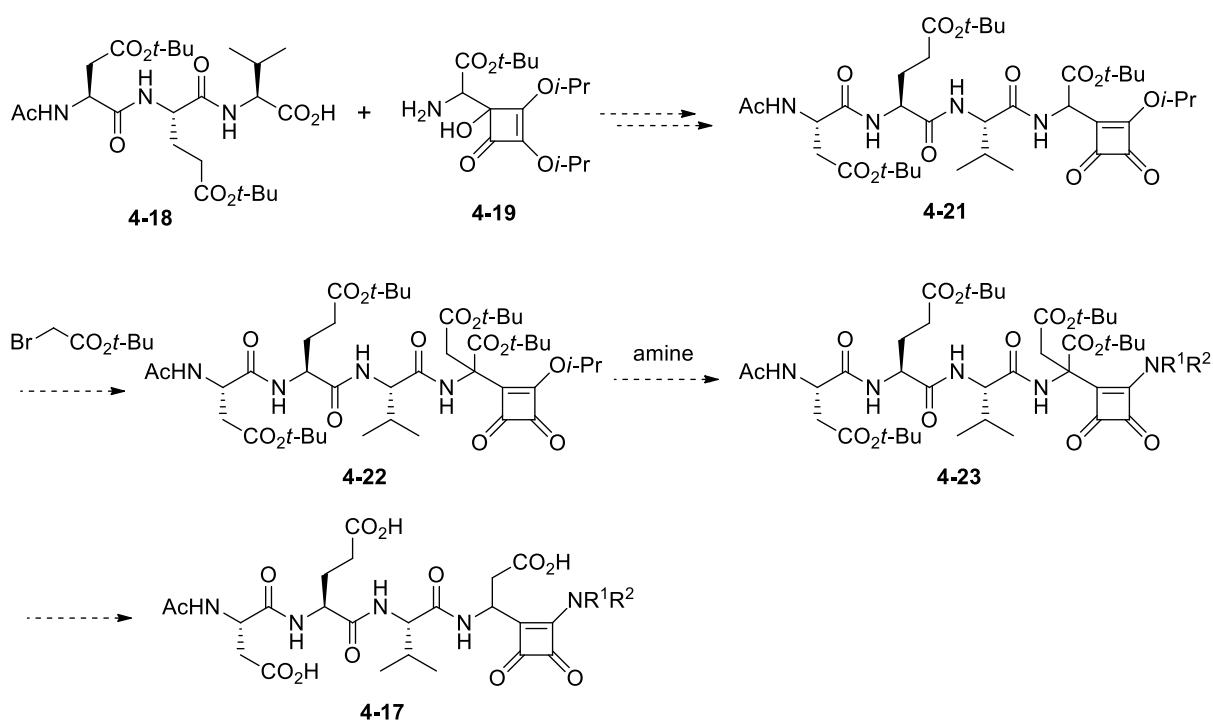
ば、Caspase-3 の S1' 部は疎水性ボールであるとされており、阻害剤の P1' 部にアルキル基を導入することで、阻害剤と Caspase-3 の間で生じる疎水性相互作用により、阻害活性が向上することを明らかにしている。<sup>14)</sup> そのため、種々のアミンを導入したいくつかの誘導体を合成し、P1' 部における置換基と活性の相関についても調査した。



**Figure 4-7.** Design of  $\alpha$ -Asq-containing caspase-3 inhibitor.

#### テトラペプチドアナログ **4-17** の合成計画

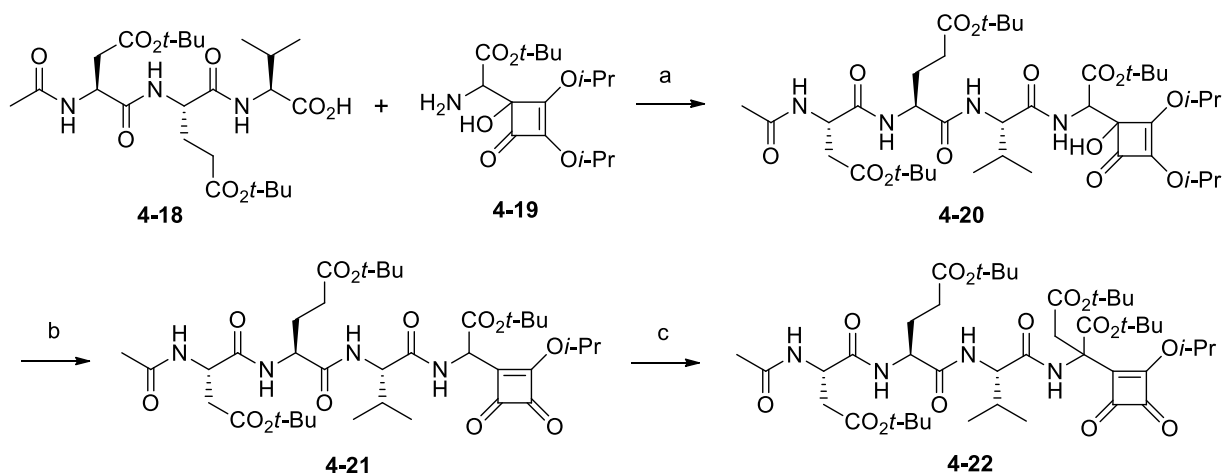
**4-17** の合成計画を Scheme 4-3 に示した。ヒドロキシシクロブテノン **4-19** とトリペプチド **4-18** を縮合した後、酸処理による Sq-エステルへの変換により **4-21** とする。**4-21** に対して、SqAsp の側鎖をプロモ酢酸 *tert*-ブチルを用いて導入し、**4-22** とする。**4-22** の C 末端の Sq-エステル部に種々のアミンを導入することにより Sq-アミド体 **4-23** とする。最後に TFA 処理によってすべての保護基の除去と、*tert*-ブトキシカルボニル基の除去を行うことで **4-17** を合成する計画である。



**Scheme 4-3.**

#### Sq-エステル 4-22 の合成

中間体となる Sq-エステル 4-22 の合成を行った(Scheme 4-4)。トリペプチド 4-18 とヒドロキシシクロブテノン 4-19 の縮合により縮合体 4-20 とし、続く塩酸処理によって 4-21 とした。4-21 に対して過剰量のブロモ酢酸 *tert*-ブチルエステルを用いた活性メチン部のアルキル化によって 4-22 を合成できた。





**Scheme 4-4.** (a) DEPBT (1.2 eq.), NaHCO<sub>3</sub> (1 eq.), THF, rt, 48 h, 79%; (b) 12*N* HCl (1 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1.5 h, 73%; (c) Br-CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>t-Bu (8 eq.), Et<sub>3</sub>N (1.2 eq.), TBAI (8 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 1 h, 72%.

### Sq-アミド体 4-17 の合成

中間体 **4-22** に対してメタノール溶媒中、種々のアミンを添加することで C 末端にアミノ基を介して置換基を導入した (Table 4-2)。一級アミンの導入は、すべてにおいて高収率で目的の Sq-アミド体 **4-23a-h** を得た(entry 1-8)。二級アミンとの反応は、環状のものを用いた場合に臨む Sq-アミド体 **4-23i, 4-23j** を与えた(entry 9, 10)。一方、Et<sub>2</sub>NH を用いた場合には望むアミド体は得られなかった(entry 11)。**4-23** に対してジクロロメタン中 TFA で処理することでジアステレオマーの混合物ながら **4-17a-j** の合成に成功した。

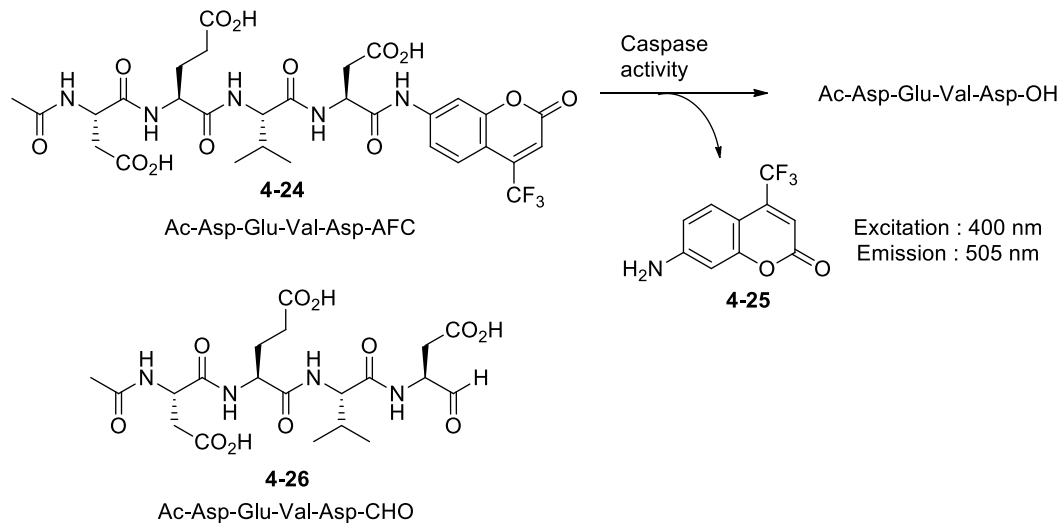
Table 4-2.

entry	amine	yield of <b>4-23</b> (%)	yield of <b>4-17</b> (%)
1	H <sub>2</sub> N-	91 ( <b>4-23a</b> )	89 ( <b>4-17a</b> )
2	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -	98 ( <b>4-23b</b> )	84 ( <b>4-17b</b> )
3	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	100 ( <b>4-23c</b> )	81 ( <b>4-17c</b> )
4	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -	80 ( <b>4-23d</b> )	82 ( <b>4-17d</b> )
5	H <sub>2</sub> N-CH(CH <sub>3</sub> )-	100 ( <b>4-23e</b> )	75 ( <b>4-17e</b> )
6	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -Ph	100 ( <b>4-23f</b> )	88 ( <b>4-17f</b> )
7	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Ph	98 ( <b>4-23g</b> )	93 ( <b>4-17g</b> )
8	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -Ph	99 ( <b>4-23h</b> )	91 ( <b>4-17h</b> )
9	HN- 	49 ( <b>4-23i</b> )	88 ( <b>4-17i</b> )
10	HN- 	47 ( <b>4-23j</b> )	92 ( <b>4-17j</b> )
11	CH <sub>3</sub> -N(CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -H	0	

### 4-3. Caspase-3,7 に対する阻害活性試験

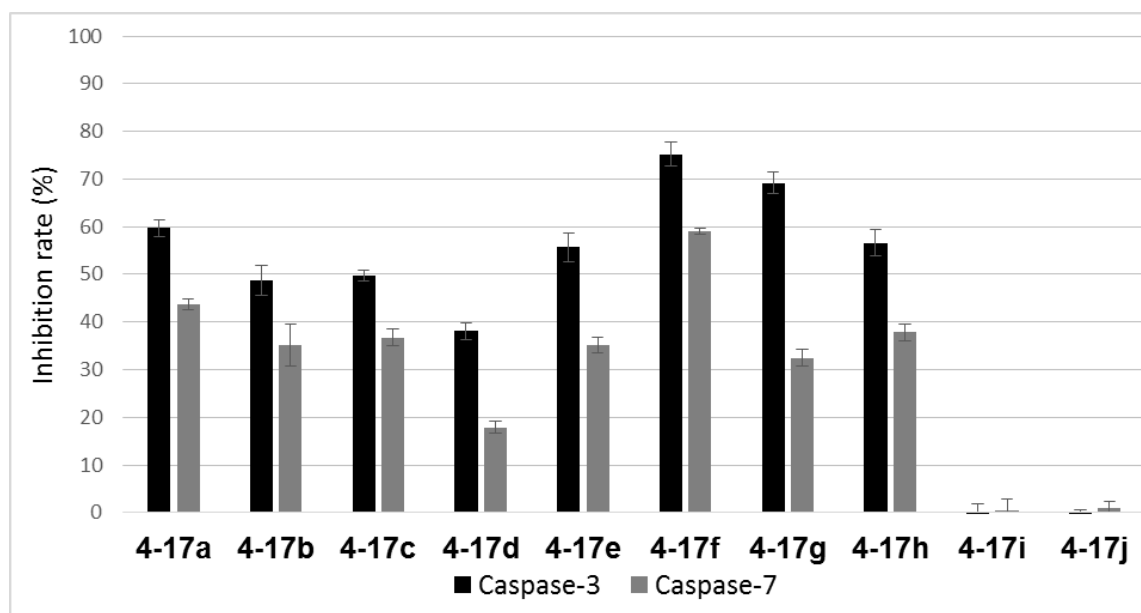
合成したテトラペプチド **4-17a-j** の Caspase-3 および Caspase-7 に対する阻害活性評価を行った。活性測定は、マイクロプレートリーダーを用いた蛍光法により行った。基質として Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AFC **4-24** を、ポジティブコントロールとしてペプチドアルデヒド Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO **4-26**<sup>15)</sup> を用いた。Ac-DEVD-AFC **4-24** はほぼ非蛍光であるが、カスパーゼの酵素活性により AFC **4-25** が遊離し、強い蛍光を発する(Ex. 400 nm, Em. 505 nm)。こ

の発光強度を測定することにより阻害率を算出する(Scheme 4-5)。Caspase と測定分子を室温で5分間反応させ、基質 **4-17** を添加し 37°C でインキュベートした。そしてインキュベート開始から 30 分後の阻害率を測定した。各サンプルにおいて 3 回同じ操作を繰り返し行った。



**Scheme 4-5.**

初めに合成した化合物 **4-17a-j** において、相対的に阻害剤としての効果が高いと思われる化合物を見つけるため、各化合物の濃度 300 nM における Caspase-3 および Caspase-7 に対する阻害率を算出した。その結果を Figure 4-8 に示した。C 末端に一級アミンを導入した Sq-アミド **4-17a-h** は Caspase-3 に対して 38-75% の阻害率を示し、Caspase-7 に対しては 18-58% の阻害率を示した。この結果、**4-17a-h** は全て Caspase-3 に対してより強い阻害率を示すことがわかった。一方で、C 末端に二級アミンを導入した Sq-アミド **4-17i, 4-17j** は測定した 300 nM において阻害活性を示さなかった。

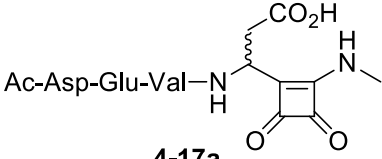
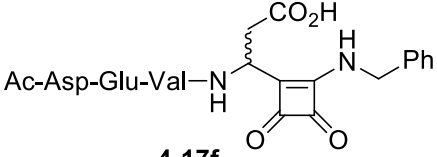
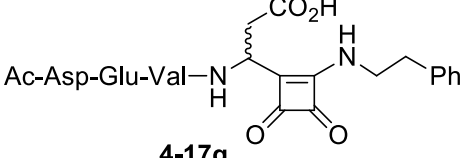
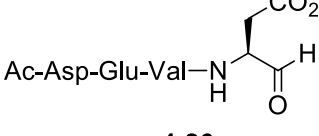


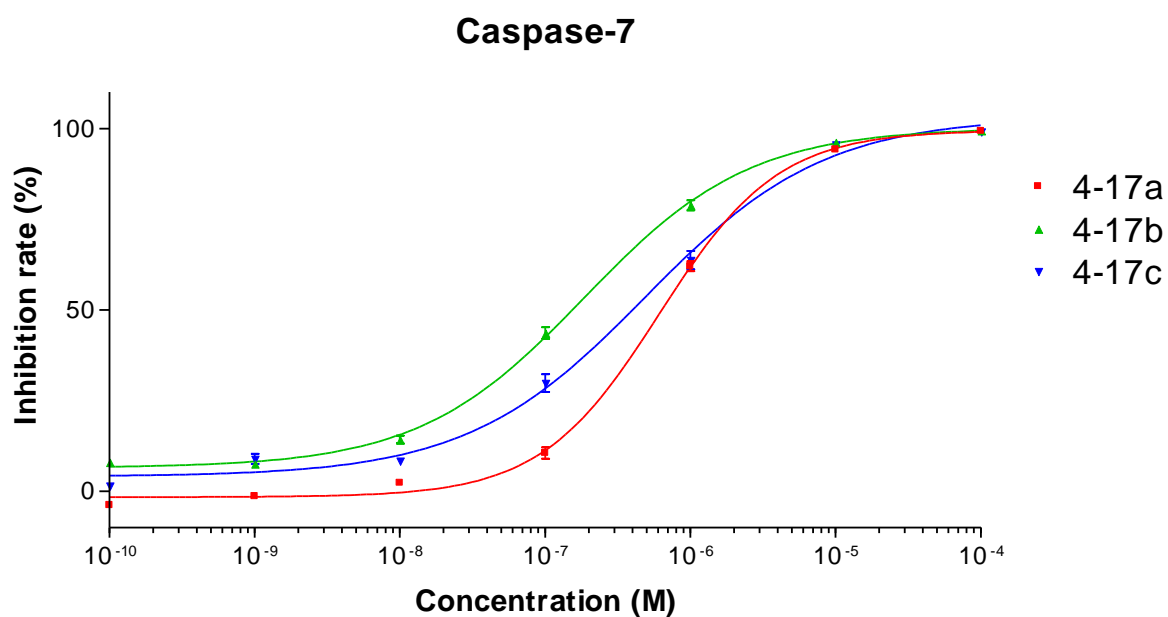
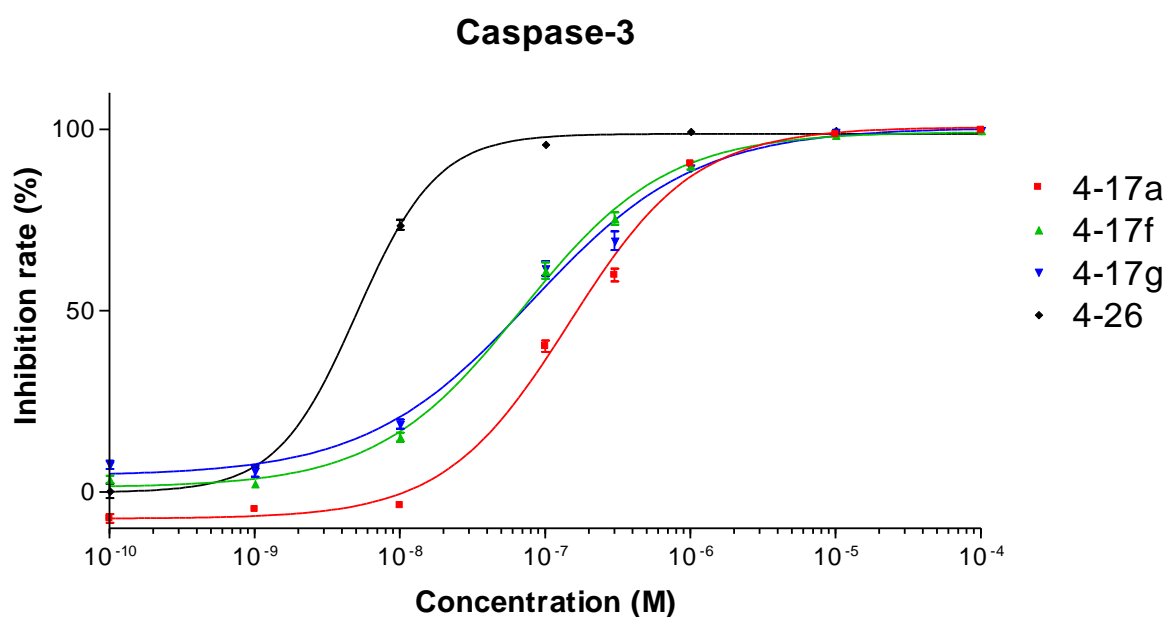
**Figure 4-8.** Inhibition screening of **4-17a-j** (300 nM) toward caspase-3 and caspase-7.



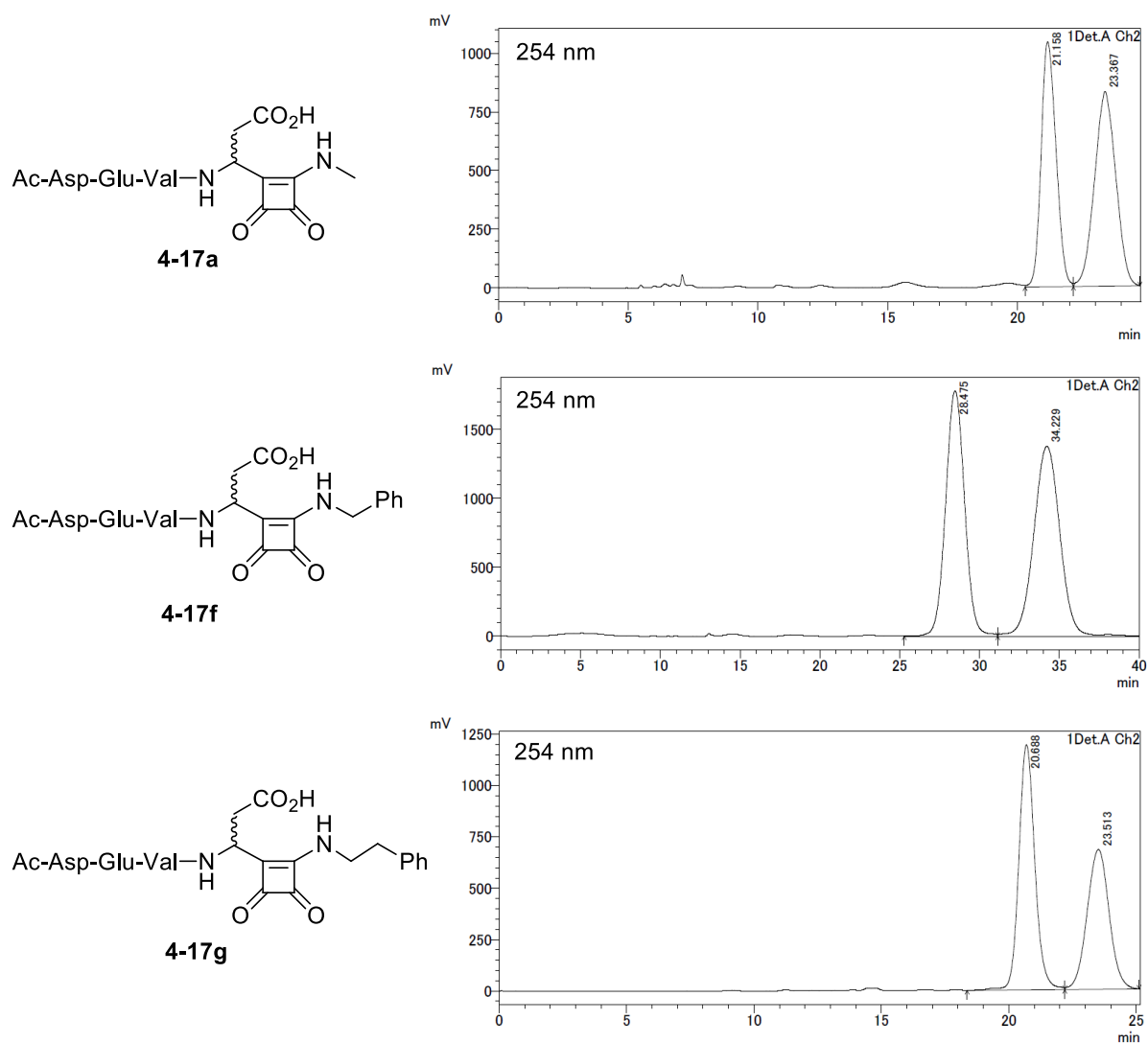
300 nM において 59-75% の阻害活性を示した 3 つの化合物 **4-17a**, **4-17f** および **4-17g** について、より詳細に阻害活性を調査することにした。Caspase-3 および Caspase-7 に対する IC<sub>50</sub> 値の算出を行った (Table 4-3)。その結果、**4-17a**, **4-17f**, および **4-17g** の Caspase-3 に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 147 nM, 68.9 nM, 80.1 nM であった。これらの Caspase-3 に対する阻害活性は既存のペプチドアルデヒド **4-26**<sup>15)</sup> に比べて 13~29 倍劣る結果となった。また、Caspase-7 に対する IC<sub>50</sub> 値は 614 nM, 186 nM, 492 nM であった。

**Table 4-3.**

inhibitor	IC <sub>50</sub> (nM)	
	Caspase-3	Caspase-7
 <p><b>4-17a</b></p>	147 ± 10.5	614 ± 31.1
 <p><b>4-17f</b></p>	68.9 ± 5.33	186 ± 12.1
 <p><b>4-17g</b></p>	80.1 ± 9.84	492 ± 65.1
 <p><b>4-26</b></p>	5.10 ± 0.286 1.3 <sup>15)</sup>	- 2.9 <sup>15)</sup>



4-17 はそれぞれ  $\alpha$ -Asq の  $\alpha$  位における 2 つのジアステレオマーの混合物であり、阻害活性本体はどちらか一方である可能性と、両方である可能性が考えられる。次に、4-17a, 4-17f, および 4-17g の 2 つのジアステレオマーをそれぞれ逆相 HPLC によって分離した後に、Caspase-3 に対する阻害活性を測定することにした。HPLC で得られたチャートを Figure 4-9 に示した。しかし、これらの分取後も立体化学を決定することはできなかったため、先に溶出する化合物を First peak isomer、後に溶出する化合物を Second peak isomer と記述する。

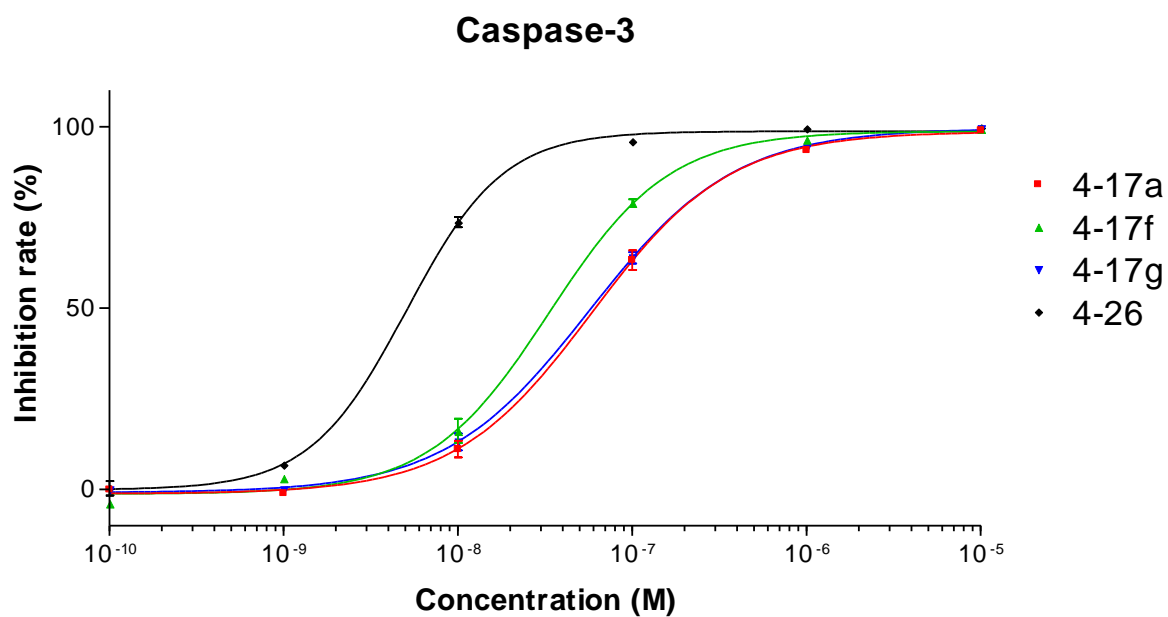


**Figure 4-9.** Separation of two diastereomers by RP-HPLC.

分離後の Caspase-3 に対する阻害活性測定の結果を Table 4-4 に示した。その結果、**4-17a**, **4-17f**, **4-17g** の Second peak isomer はそれぞれ 60 nM, 35 nM, 57 nM の阻害活性を示し、混合物状態よりも阻害活性が向上した。一方で、それぞれの First peak isomer は 1  $\mu$ M の濃度においても阻害活性を示さなかった。これにより、Second peak isomer が天然型アミノ酸の L 体に相当する立体化学を有していると推察している。これらの正確な立体化学の決定は今後の課題である。

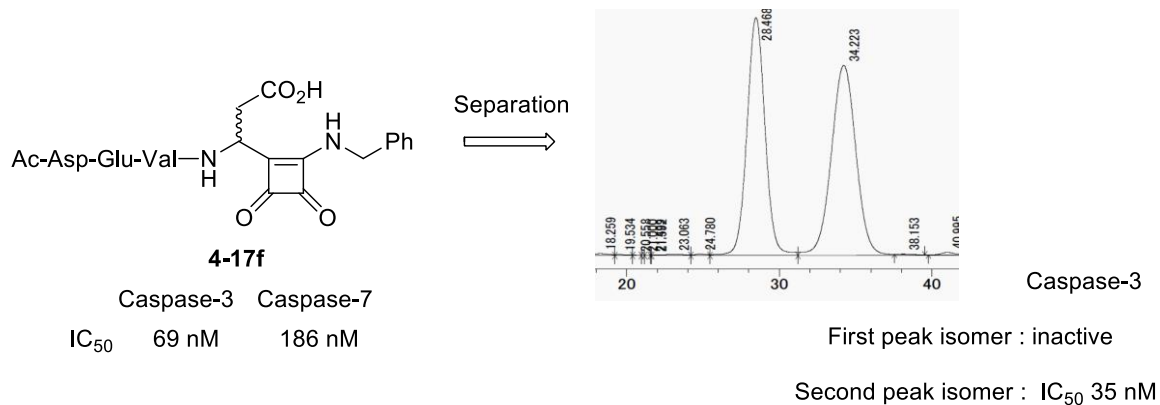
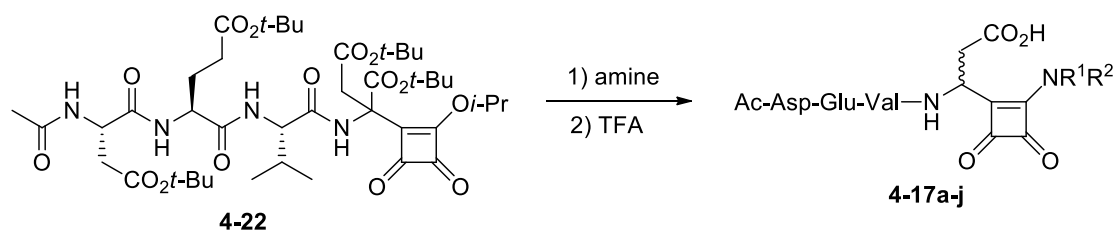
**Table 4-4.**

Inhibitor		IC <sub>50</sub> (nM) Caspase-3
<chem>CC(=O)N[C@@H](Cc1c(=O)c(=O)c1C(=O)O)C[C@@H](C(=O)O)C[C@@H](C(=O)O)C(=O)N</chem> <b>4-17a</b>	First peak isomer Second peak isomer	> 1000 59.6 ± 3.56
<chem>CC(=O)N[C@@H](Cc1c(=O)c(=O)c1C(=O)O)C[C@@H](C(=O)O)C[C@@H](C(=O)O)C(=O)NCC1=CC=CC=C1</chem> <b>4-17f</b>	First peak isomer Second peak isomer	> 1000 34.8 ± 2.73
<chem>CC(=O)N[C@@H](Cc1c(=O)c(=O)c1C(=O)O)C[C@@H](C(=O)O)C[C@@H](C(=O)O)C(=O)NCC1=CC=CC=C1CC1</chem> <b>4-17g</b>	First peak isomer Second peak isomer	> 1000 57.3 ± 2.73
<chem>CC(=O)N[C@@H](C[C@@H](C(=O)O)C(=O)O)C[C@@H](C(=O)O)C[C@@H](C(=O)O)C(=O)N</chem> <b>4-26</b>		5.10 ± 0.286 1.3 <sup>15)</sup>

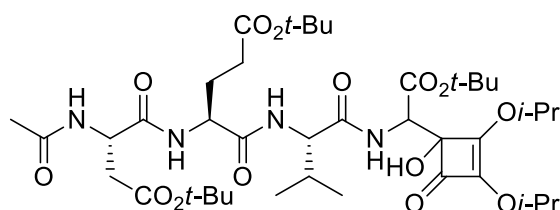


## 第四章まとめ

本章では、 $\alpha$ -Asq を用いた Caspase-3 阻害剤の開発について述べた。 $\alpha$ -Asq をカスパーゼ-3, 7 の認識配列 Asp-Glu-Val-Asp の C 末端に導入した阻害剤 **4-17** を設計した。中間体 **4-22** から種々のアミンとの反応によって、P1' 部に異なる置換基を導入した 10 種類の **4-17** をジアステレオマーの混合物として合成に成功した。その結果、P1' 部に一級アミンを導入した場合において、Caspase-3 阻害活性が認められた。中でも、C 末端にベンジルアミンを導入した **4-17f** は最も強い阻害活性を示し、Caspase-3 に対して IC<sub>50</sub> 値 69 nM、Caspase-7 に対して IC<sub>50</sub> 値 186 nM であった。また、 $\alpha$ -Asq の  $\alpha$  位部分における 2 つのジアステレオマーを HPLC によって分離して阻害活性を調査した。その結果、先に溶出するアイソマーには活性がない一方で、後に溶出するアイソマーはジアステレオマーの混合物状態よりも強い活性を示した (**4-17f**: IC<sub>50</sub> 値 35 nM)。この結果、後に溶出したアイソマーを天然型のアミノ酸と同じ L 体であると推測した。今回の結果により、 $\alpha$ -Asq がシステインプロテアーゼのチオールアクセプターとして働くことを証明できた。本分子設計は Caspase に限らず、他のシステインプロテアーゼの阻害剤設計にも展開できると考えている。

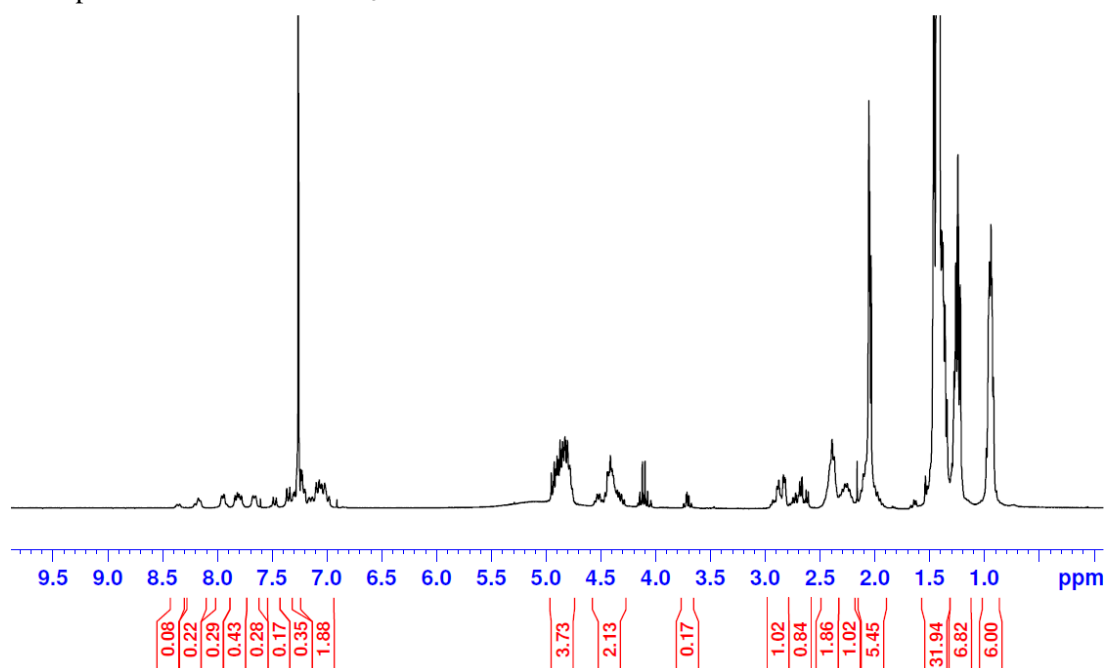


**Ac-L-Asp(O*t*-Bu)-L-Glu(O*t*-Bu)-L-Val-[*tert*-butyl-2-amino-2-(1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxo-cyclobut-2-en-1-yl)acetate] (4-20)**

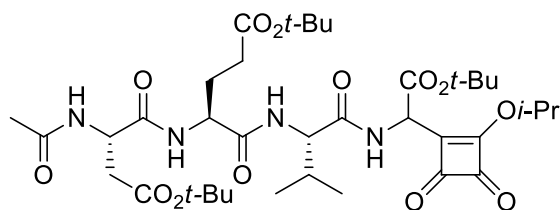


To a mixture of tripeptide **4-18** (1.03 g, 2.00 mmol) and amine **4-19** (0.927 g, 2.00 mmol) in THF (20 mL) were added NaHCO<sub>3</sub> (0.168 g, 2.00 mmol) and DEPBT (0.717 g, 2.40 mmol) at 0 °C. The mixture was stirred for 48 h at room temperature. The mixture was quenched with 0.5*N* HCl (15 mL) and extracted with EtOAc (15 mL x 3). The combined organic layers were washed with 1*N* HCl (20 mL), sat. NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) and brine (30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-0/1) to give **4-20** (1.30 g, 79%, as a mixture of diastereomers) as a pale white amorphous solid: HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>40</sub>H<sub>66</sub>N<sub>4</sub>O<sub>14</sub>+Na]<sup>+</sup> 849.4473, found 849.4471.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-20** in CDCl<sub>3</sub>.



**Ac-L-Asp(O*t*-Bu)-L-Glu(O*t*-Bu)-L-Val-[α-(*tert*-butoxycarbonyl)SqGly]-O*i*-Pr (4-21)**



To a solution of **4-20** (1.30 g, 1.57 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (16 mL) was added 12 *N* HCl (138 μL, 1.57 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 1 h. The mixture was quenched with NaHCO<sub>3</sub>, and filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-0/1) to give **4-21** (0.870 g, 73%, as a mixture of ca. 1:1 diastereomers) as a yellow amorphous solid:

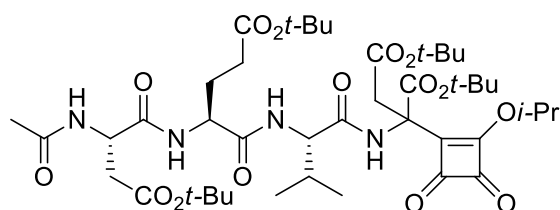
FTIR (neat) 3276, 2979, 1800, 1733, 1630, 1533, 1391, 1368, 1300, 1218, 1149, 1094, 752 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ 7.98 (d, *J* = 5.4 Hz, 1/2H), 7.86 (d, *J* = 5.7 Hz, 1/2H), 7.52 (d, *J* = 4.2 Hz, 1/2H), 7.44 (d, *J* = 7.5 Hz, 1/2H), 7.29 (d, *J* = 9.0 Hz, 1/2H), 7.22 (d, *J* = 9.0 Hz, 1/2H), 6.97 (d, *J* = 7.8 Hz, 1/2H), 6.91 (d, *J* = 7.8 Hz, 1/2H), 5.58 (m, 1H), 5.41 (m, 1H), 4.72 (m, 1H), 4.40 (m, 1H), 4.25 (m, 1H), 2.91-2.62 (m, 2H), 2.51-2.22 (m, 3H), 2.20-1.98 (m, 5H), 1.50-1.25 (m, 33H), 0.99-0.82 (m, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 196.8, 196.6, 194.1, 194.0, 191.9, 191.7, 174.7, 174.5, 174.2, 174.1, 171.8, 171.4, 171.2, 171.11, 171.07, 171.0, 170.4, 165.2, 164.9, 84.2, 84.0, 82.1, 82.0, 81.6, 81.4, 80.5, 80.3, 58.6, 58.4, 55.1, 54.6, 49.9, 49.7, 49.6, 48.9, 37.3, 37.0, 32.0, 29.7, 29.6, 28.01, 27.97, 27.95, 27.81, 27.78, 26.2, 26.0, 23.0, 22.8, 22.6;

HRMS (ESI) *m/z* (M-H)<sup>-</sup>calcd for [C<sub>37</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>-H]<sup>-</sup> 765.3928, found 765.3933.

#### Ac-L-Asp(O*t*-Bu)-L-Glu(O*t*-Bu)-L-Val-[α-(*tert*-butoxycarbonyl)SqAsp(O*t*-Bu)]-O*i*-Pr (**4-22**)



To a solution of **4-21** (0.820 g, 1.07 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) were added *tert*-butyl bromoacetate (1.26 mL, 8.56 mmol) and TBAI (3.16 g, 8.56 mmol) at room temperature. Et<sub>3</sub>N (179 μL, 1.28 mmol) was added to the mixture. The mixture was stirred for 1 h, concentrated *in vacuo*. The residue was filtrated through a celite pad using EtOAc. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-1/5) to give **4-22** (0.680 g, 72%, as a mixture of ca. 3:2 two diastereomers) as a yellow amorphous solid:

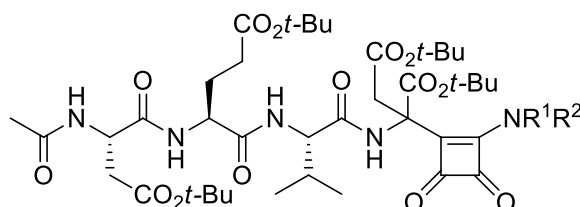
FTIR (neat) 3279, 2979, 1796, 1636, 1595, 1540, 1393, 1369, 1249, 1152, 754 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ 7.52 (m, 8/5H), 7.33 (s, 2/5H), 7.16 (d, *J* = 8.4 Hz, 3/5H), 7.08 (d, *J* = 8.7 Hz, 2/5H), 6.82 (d, *J* = 8.1 Hz, 3/5H), 6.77 (d, *J* = 8.1 Hz, 2/5H), 5.43 (m, 1H), 5.74 (m, 1H), 4.42-4.22 (m, 2H), 3.61-3.44 (m, 2H), 2.92 (t, *J* = 4.8 Hz, 2/5H), 2.86 (t, *J* = 4.8 Hz, 3/5H), 2.61 (t, *J* = 6.0 Hz, 3/5H), 2.57 (t, *J* = 6.0 Hz, 2/5H), 2.50-1.88 (m, 8H), 1.50-1.25 (m, 42H), 0.99-0.79 (m, 6H);

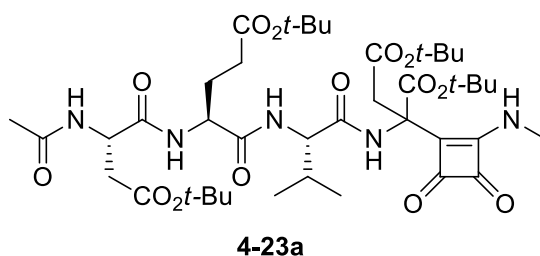
<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 195.2, 195.1, 193.63, 193.59, 190.77, 190.69, 176.8, 176.6, 173.6, 173.4, 171.4, 171.3, 171.0, 170.8, 170.7, 170.2, 170.13, 170.08, 169.9, 168.7, 165.7, 165.6, 84.6, 84.4, 81.9, 81.8, 81.7, 81.1, 81.0, 80.5, 80.4, 59.92, 59.89, 58.5, 57.7, 53.6, 53.4, 49.43, 49.37, 37.8, 37.6,

37.0, 36.9, 31.82, 37.77, 30.8, 30.2, 28.04, 27.99, 27.9, 27.6, 26.8, 26.7, 23.2, 22.7;  
HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>43</sub>H<sub>68</sub>N<sub>4</sub>O<sub>15</sub>+Na]<sup>+</sup> 903.4579, found 903.4573.

**Ac-L-Asp(Ot-Bu)-L-Glu(Ot-Bu)-L-Val-[ $\alpha$ -(*tert*-butoxycarbonyl)SqAsp(Ot-Bu)]-NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> (4-23a-j)**



To a solution of **4-22** (15.0 mg, 0.0186 mmol) in MeOH (1 mL) was added appropriate amine (0.0186 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 3-10 min and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (0-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give the corresponding squaric amide **4-23a-j** in the indicated yield (table 4-2).

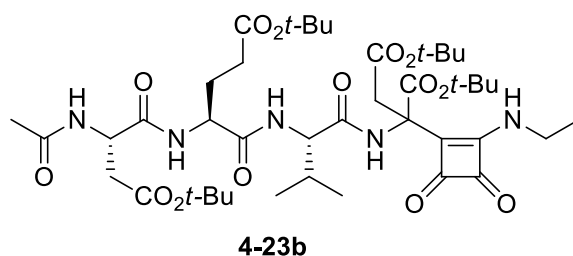
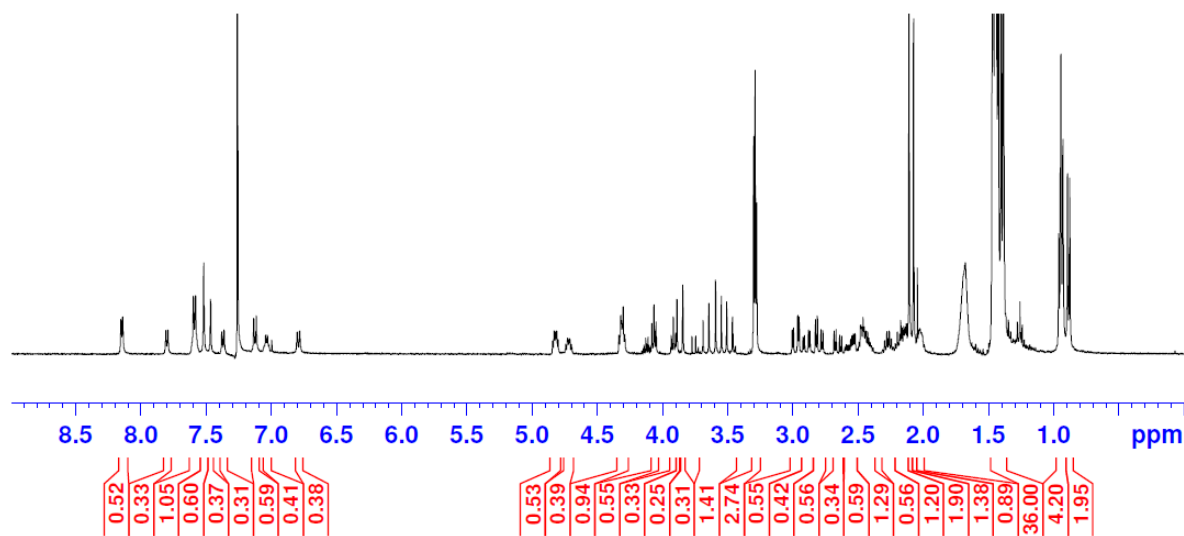


<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  193.9, 193.8, 188.1, 187.9, 181.0, 180.7, 174.8, 174.1, 172.4, 172.3, 171.9, 171.5, 171.3, 171.3, 170.6, 170.5, 170.5, 169.8, 169.5, 167.3, 167.1, 162.9, 162.9, 84.2, 83.9, 82.4, 82.0, 81.9, 81.6, 81.5, 81.2, 60.4, 60.2, 60.2, 60.1, 54.9, 53.8, 49.7, 49.6, 37.5, 37.2, 36.9, 36.7, 32.0, 31.8, 31.7, 31.5, 29.6, 29.4, 28.0, 28.0, 27.9, 27.9, 27.6, 27.5, 26.4, 25.5, 23.1, 19.4, 19.3, 18.2, 18.0

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>41</sub>H<sub>65</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub>+Na]<sup>+</sup> 874.4420, found 874.4422.



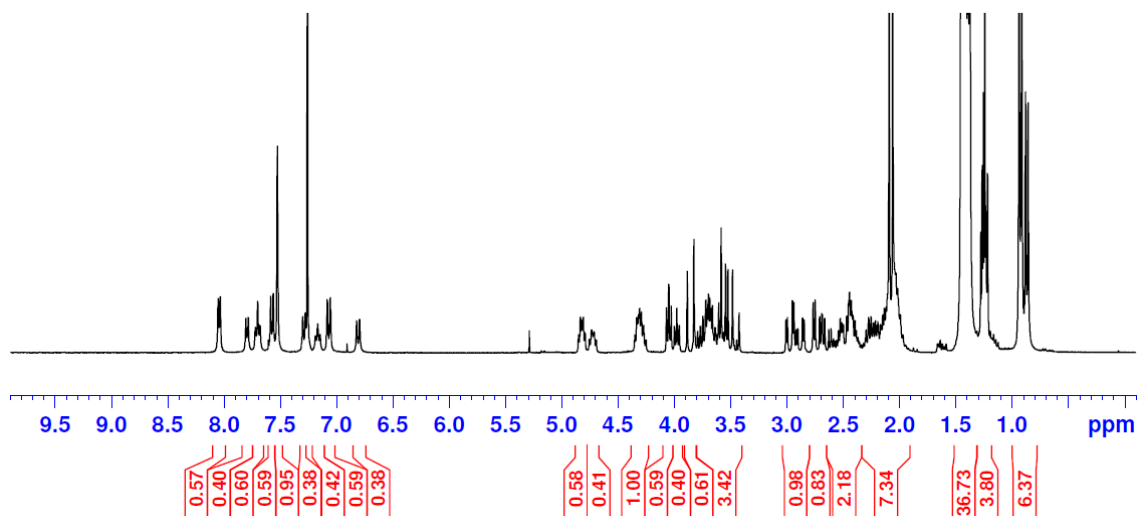
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-23a** in CDCl<sub>3</sub>.

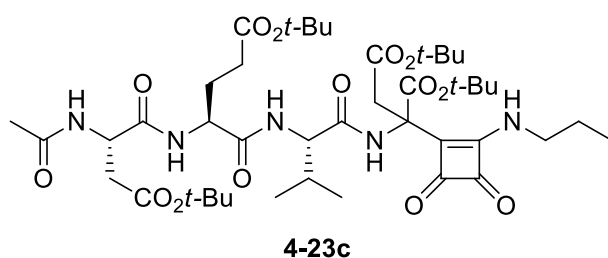


<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.7, 193.6, 187.9, 187.9, 180.5, 180.1, 174.7, 174.1, 172.3, 172.1, 171.9, 171.5, 171.3, 170.6, 170.5, 169.6, 169.5, 167.3, 167.0, 163.0, 162.8, 84.1, 83.9, 82.3, 82.0, 81.8, 81.6, 81.5, 81.2, 60.3, 60.2, 59.9, 54.6, 54.0, 49.7, 49.5, 40.1, 37.4, 36.8, 36.7, 32.0, 31.9, 29.6, 29.4, 28.0, 28.0, 28.0, 27.9, 27.9, 27.6, 27.5, 26.3, 25.4, 23.2, 19.4, 19.3, 17.9, 17.7, 16.3, 16.1;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub>+Na]<sup>+</sup> 888.4577, found 888.4577.

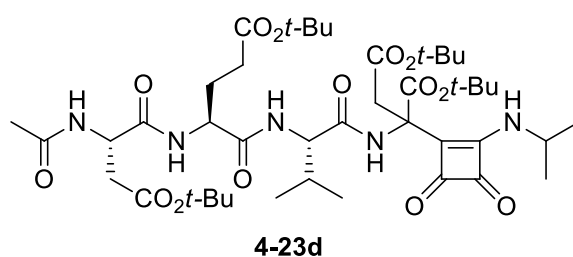
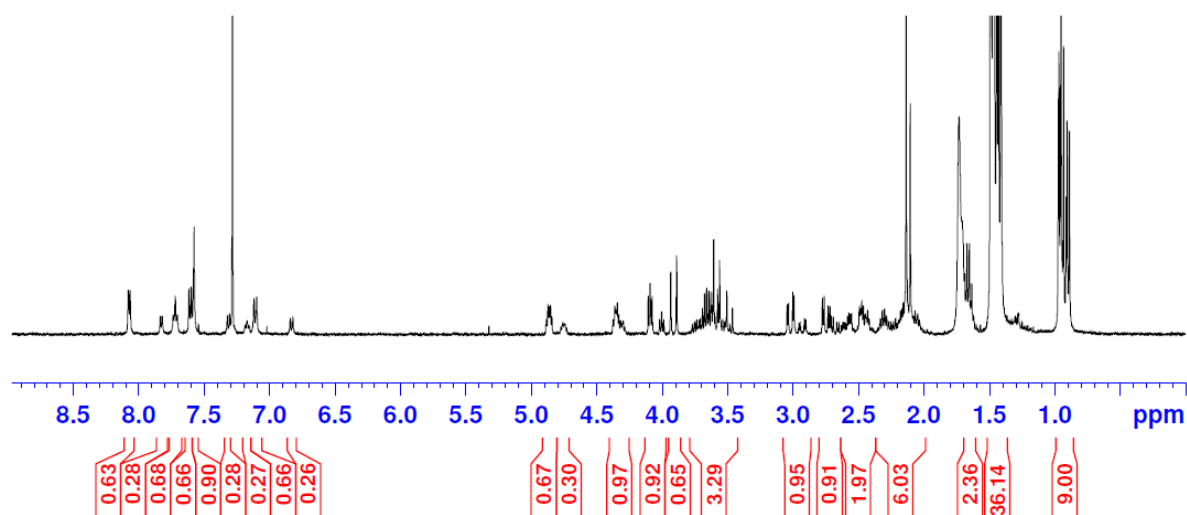
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-23b** in CDCl<sub>3</sub>.





$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.7, 193.6, 188.0, 188.0, 180.8, 180.4, 174.7, 174.1, 172.3, 172.0, 171.9, 171.4, 171.4, 171.3, 170.6, 170.5, 169.6, 169.5, 167.3, 167.0, 162.8, 162.6, 84.0, 83.8, 82.3, 82.0, 81.7, 81.5, 81.2, 60.2, 60.1, 59.9, 54.6, 54.0, 49.7, 49.5, 46.6, 37.4, 36.8, 36.7, 32.0, 31.9, 29.6, 29.4, 28.0, 28.0, 27.9, 27.9, 27.6, 27.5, 26.2, 25.3, 24.0, 23.9, 23.1, 19.4, 19.3, 17.9, 17.6, 10.7, 10.6;  
 HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_{14}+\text{Na}]^+$  902.4733, found 902.4732.

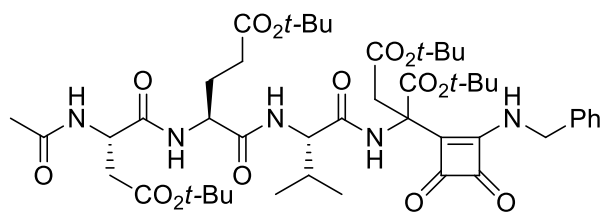
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **4-23c** in  $\text{CDCl}_3$ .



$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.6, 187.8, 179.9, 179.2, 174.6, 172.2, 171.9, 171.5, 170.5, 169.7, 169.4, 167.2, 162.6, 83.8, 82.2, 81.7, 81.6, 81.5, 81.3, 60.1, 60.0, 59.4, 54.5, 54.3, 49.7, 49.4, 47.7, 47.4, 37.4, 36.7, 32.0, 31.5, 29.4, 28.1, 28.0, 27.9, 27.9, 27.6, 27.5, 25.3, 23.6, 23.5, 23.4, 23.3, 23.2, 22.6, 19.4, 17.7, 17.5, 14.1;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{43}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_{14}+\text{Na}]^+$  902.4733, found 902.4733.



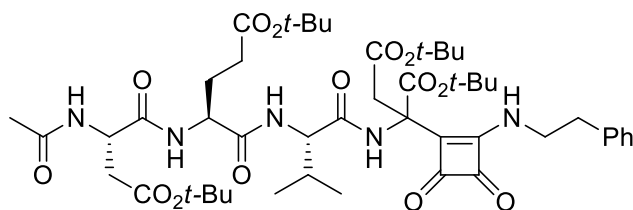
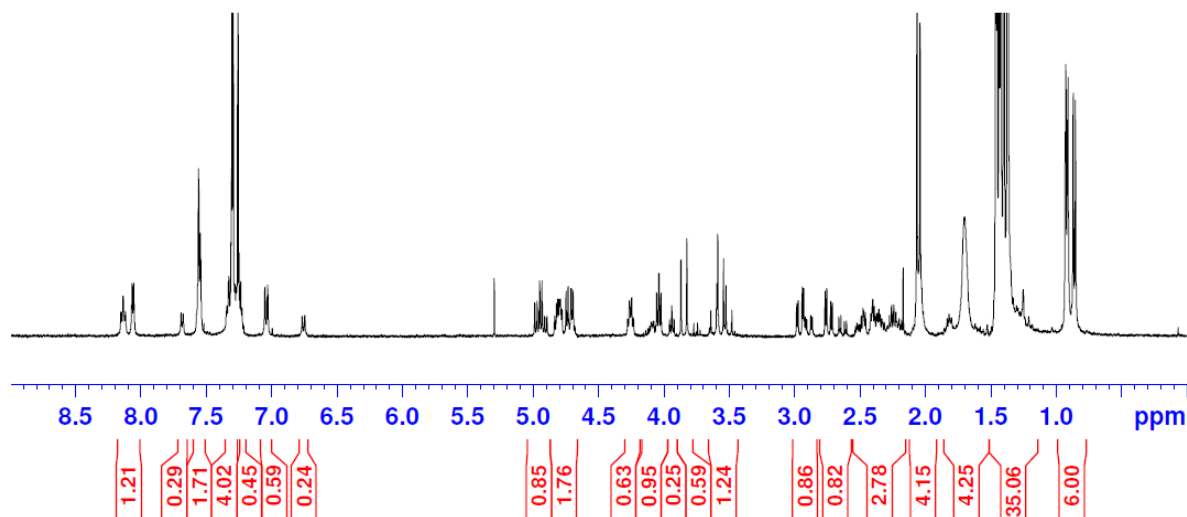


**4-23f**

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.5, 193.5, 188.1, 187.9, 180.8, 180.4, 174.8, 174.2, 172.2, 172.2, 171.9, 171.4, 171.4, 171.3, 170.6, 170.5, 169.7, 169.5, 169.5, 167.3, 166.9, 163.6, 163.5, 137.7, 137.5, 128.7, 128.6, 127.6, 127.6, 127.3, 84.2, 83.9, 82.3, 82.0, 81.8, 81.6, 81.3, 60.2, 60.1, 60.0, 54.7, 53.9, 49.6, 49.5, 48.3, 37.5, 37.3, 36.9, 36.8, 31.9, 31.8, 29.6, 29.4, 28.0, 28.0, 27.9, 27.9, 27.5, 27.4, 25.9, 25.1, 23.1, 19.4, 19.3, 18.0, 17.8;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{47}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_{14}+\text{Na}]^+$  950.4733, found 950.4731.

$^1\text{H}$  NMR spectrum of **4-23f** in  $\text{CDCl}_3$ .

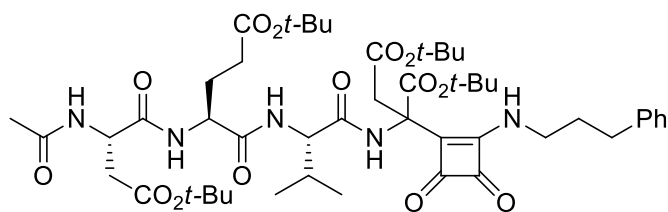
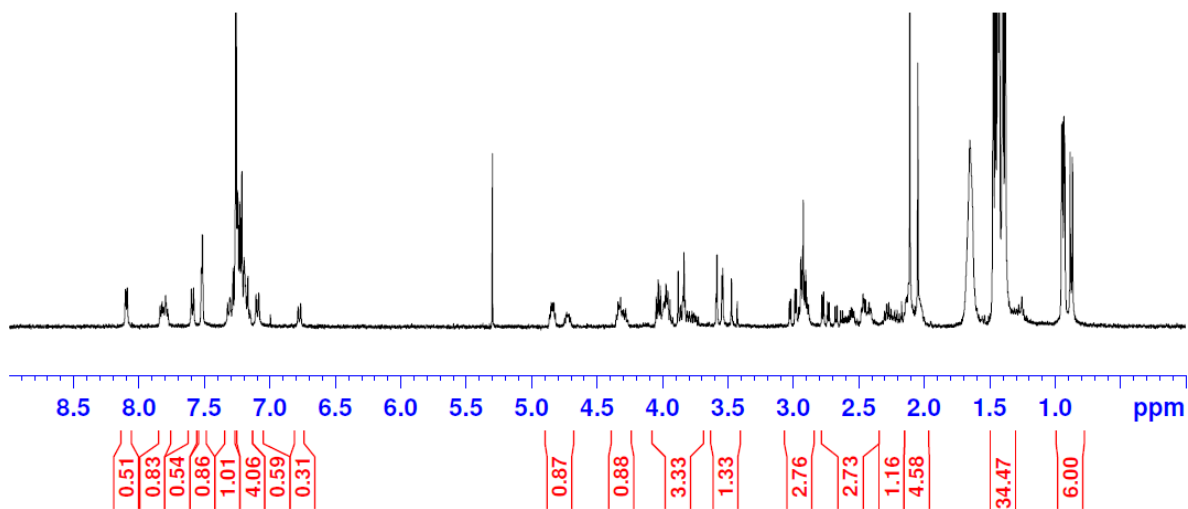


**4-23g**

$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.2, 188.0, 180.4, 174.8, 174.2, 172.4, 172.2, 171.9, 171.5, 171.4, 170.5, 169.6, 169.5, 169.5, 167.3, 162.6, 137.8, 137.7, 129.0, 129.0, 128.6, 128.4, 126.5, 84.1, 83.8, 82.4, 82.1, 81.9, 81.6, 81.2, 60.3, 60.2, 59.9, 54.7, 54.1, 49.5, 46.2, 37.4, 37.1, 36.8, 32.0, 29.4, 28.1, 28.0, 27.9, 27.9, 27.6, 27.5, 25.3, 23.2, 19.3, 17.6;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{48}\text{H}_{71}\text{N}_5\text{O}_{14}+\text{Na}]^+$  964.4890, found 964.4895.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-23g** in CDCl<sub>3</sub>.

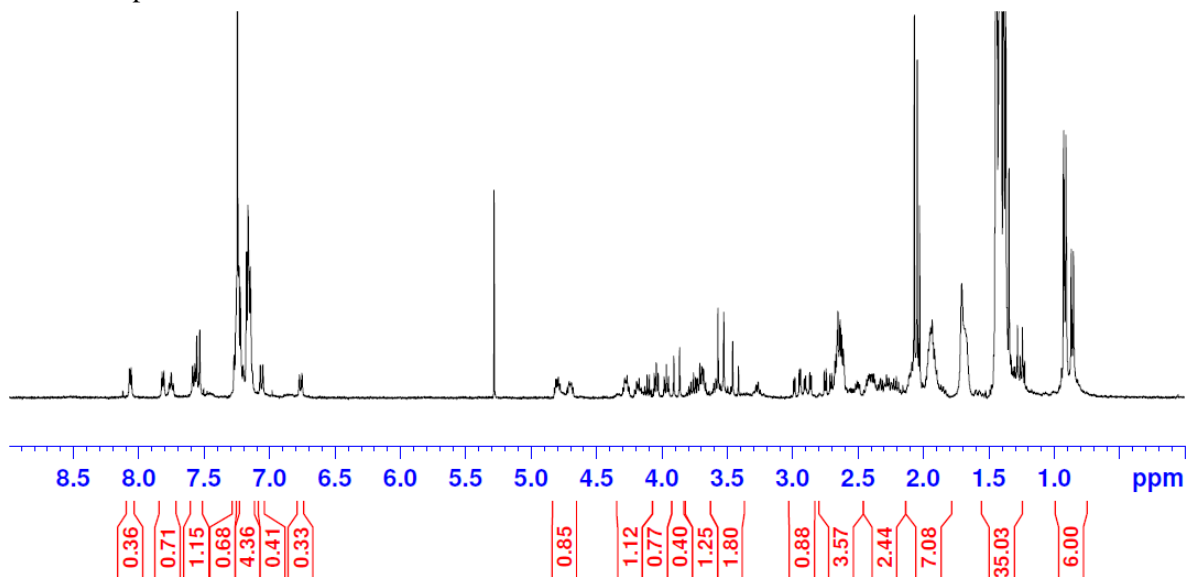


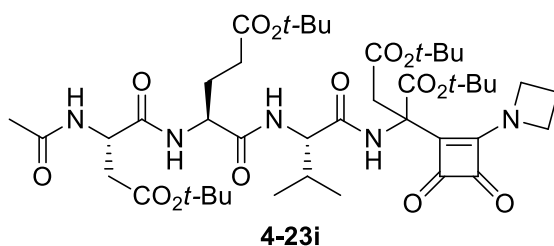
**4-23h**

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.5, 188.0, 180.5, 174.8, 174.3, 172.3, 172.0, 171.9, 171.5, 170.7, 170.5, 169.5, 167.3, 167.0, 162.9, 141.2, 141.1, 128.4, 126.0, 125.9, 84.1, 83.8, 82.3, 82.0, 81.8, 81.6, 81.5, 81.2, 60.3, 60.2, 59.9, 59.8, 54.7, 54.2, 49.7, 49.5, 44.6, 37.5, 36.8, 36.7, 32.4, 32.3, 32.2, 31.9, 29.5, 29.4, 28.0, 28.0, 27.9, 27.9, 27.6, 27.5, 25.2, 23.1, 19.4, 19.3, 17.9, 17.7;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>49</sub>H<sub>73</sub>N<sub>5</sub>O<sub>14</sub>+Na]<sup>+</sup> 978.5046, found 978.5050.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-23h** in CDCl<sub>3</sub>.

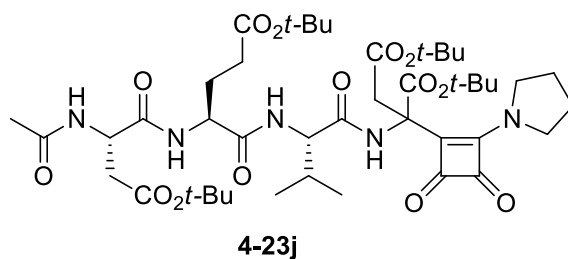
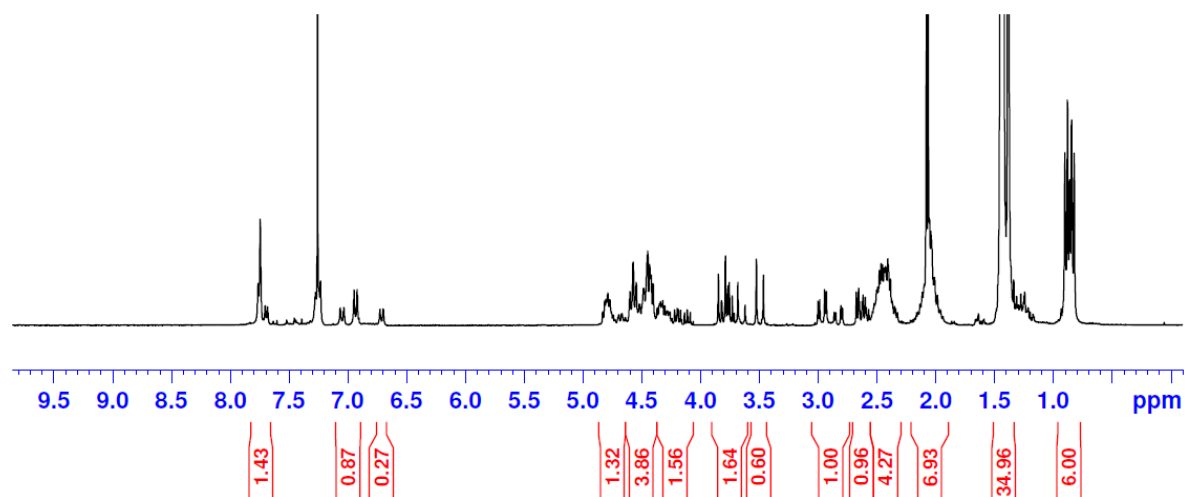




$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.9, 193.4, 187.7, 187.5, 176.7, 173.9, 173.5, 171.7, 171.6, 171.4, 171.3, 171.3, 170.4, 170.3, 170.0, 169.8, 169.6, 168.4, 167.9, 161.5, 160.7, 84.1, 83.8, 81.9, 81.9, 81.4, 81.3, 81.3, 60.2, 59.8, 58.6, 58.6, 56.9, 54.8, 54.6, 54.3, 49.5, 49.4, 38.0, 37.2, 36.9, 36.7, 32.0, 30.8, 29.9, 28.0, 28.0, 28.0, 27.6, 26.4, 23.2, 19.3, 17.9, 17.8, 16.9;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{43}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_{14}+\text{Na}]^+$  900.4577, found 900.4581.

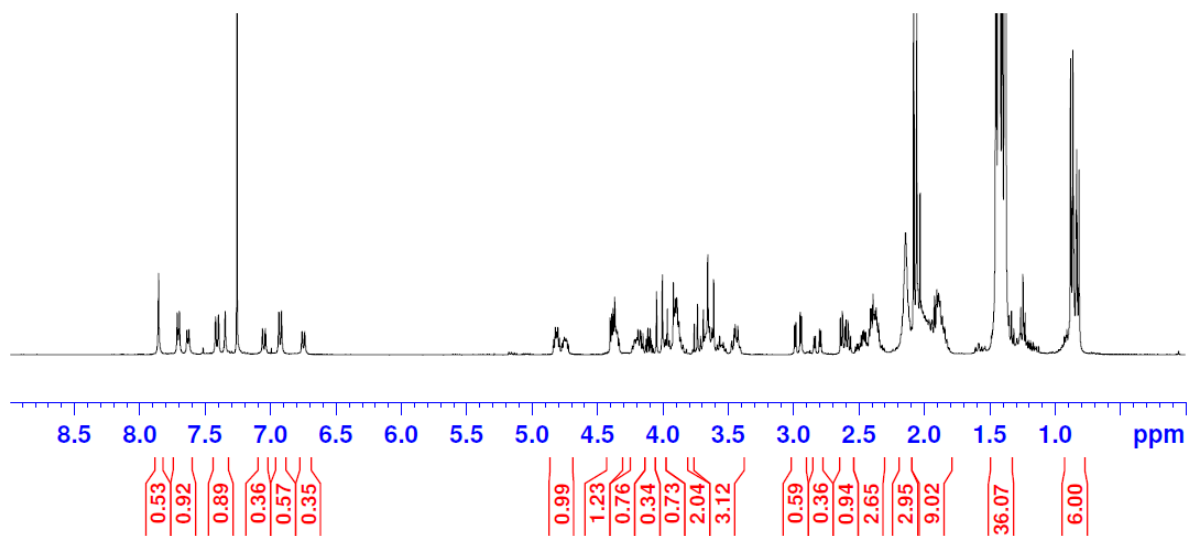
$^1\text{H}$  NMR spectrum of **4-23i** in  $\text{CDCl}_3$ .



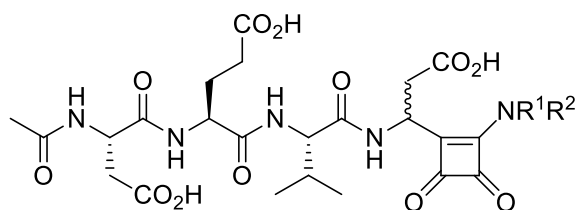
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  194.2, 193.6, 188.1, 188.0, 176.7, 173.9, 173.5, 171.6, 171.6, 171.5, 171.2, 170.3, 170.2, 170.2, 169.6, 168.9, 168.4, 161.5, 160.9, 84.2, 83.9, 81.9, 81.9, 81.4, 81.3, 81.3, 81.2, 60.5, 60.1, 58.8, 58.6, 54.4, 54.2, 51.7, 51.5, 50.1, 49.6, 49.4, 38.3, 37.9, 36.9, 36.6, 32.0, 30.8, 29.9, 28.1, 28.0, 28.0, 28.0, 27.6, 27.6, 26.5, 25.5, 25.0, 23.2, 23.2, 19.4, 19.3, 17.8, 16.9;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_5\text{O}_{14}+\text{Na}]^+$  914.4733, found 914.4736.

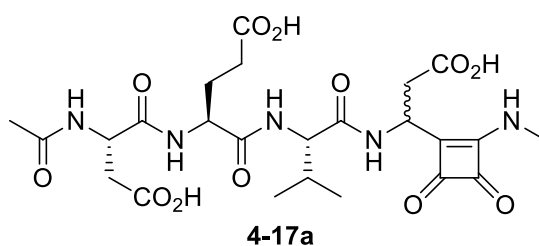
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-23j** in CDCl<sub>3</sub>.



**Ac-L-Asp-L-Glu-L-Val-[Sq-Asp]-NR<sup>1</sup>R<sup>2</sup> (4-17a-j)**

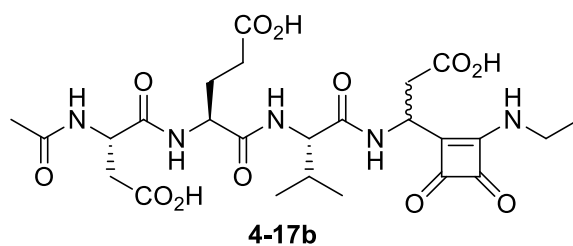
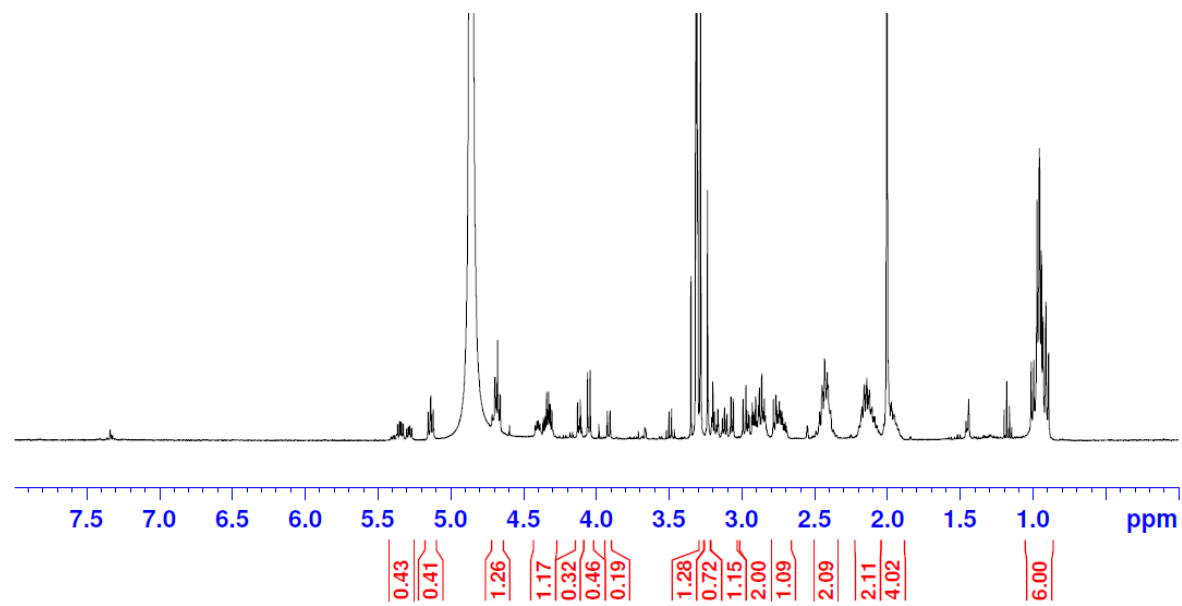


To a solution of protected peptide **4-23a-j** in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) was added TFA (0.5 mL) for 24 h at room temperature. The solvent was removed under reduced pressure, and the residue washed with Et<sub>2</sub>O (1 mL x 2). The pale yellow solids were then dried under high vacuum. Products **4-17a-j** were obtained in the indicated yield:



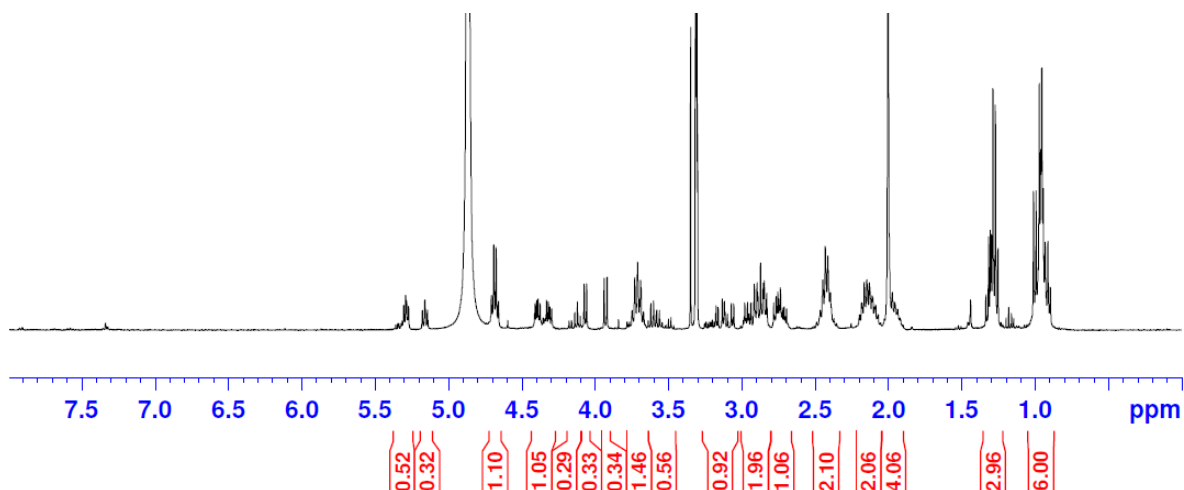
HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 606.2023, found 606.2029.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17a** in CD<sub>3</sub>OD.

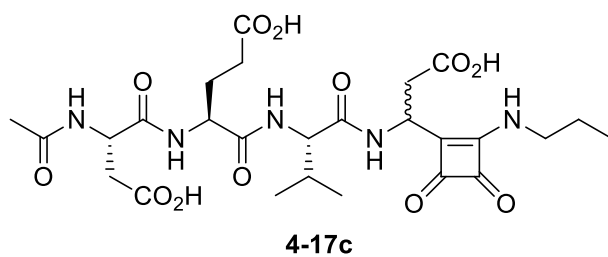


HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>25</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 620.2180, found 620.2174.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17b** in CD<sub>3</sub>OD.

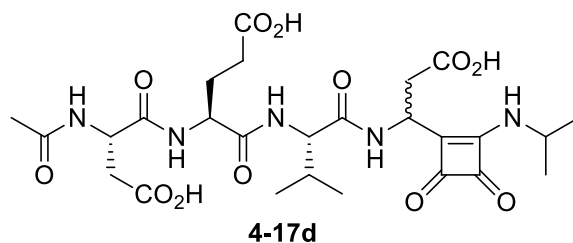
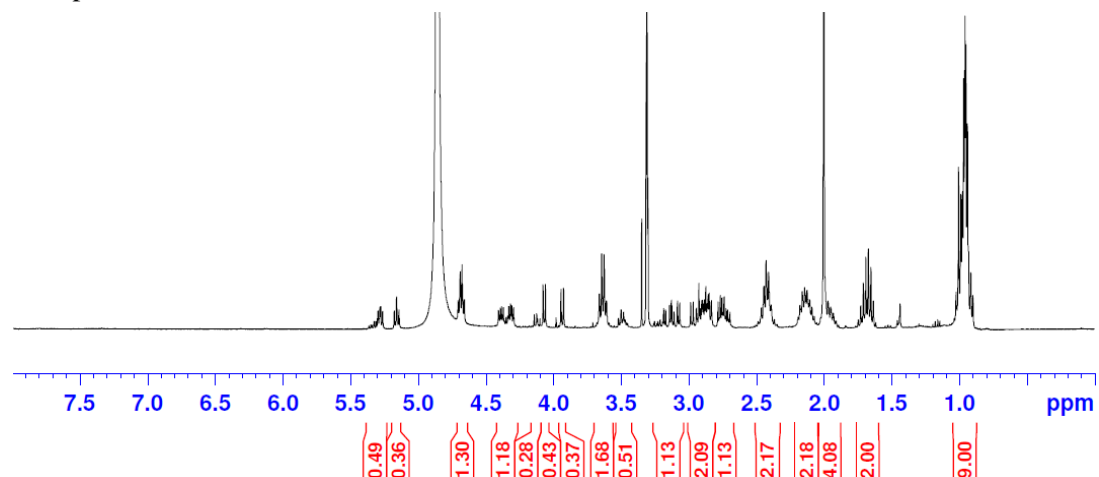






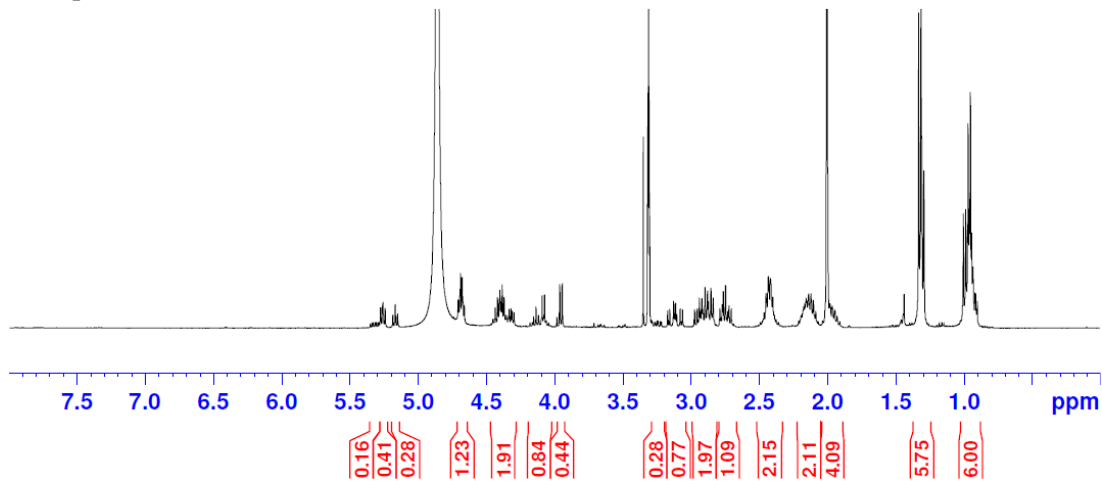
HRMS (ESI)  $m/z$  ( $M+Na$ )<sup>+</sup>calcd for  $[C_{26}H_{37}N_5O_{12}+Na]^+$  634.2336, found 634.2330.

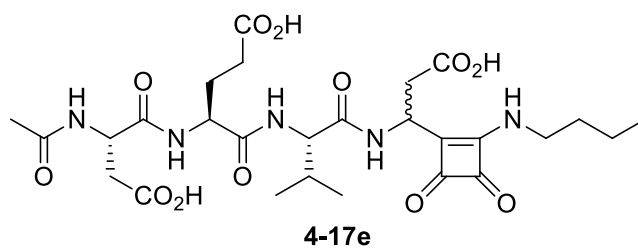
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17c** in CD<sub>3</sub>OD.



HRMS (ESI)  $m/z$  ( $M+Na$ )<sup>+</sup>calcd for  $[C_{26}H_{37}N_5O_{12}+Na]^+$  634.2336, found 634.2333.

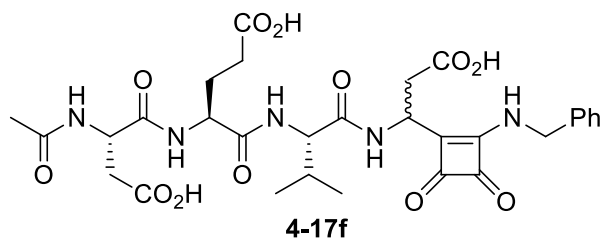
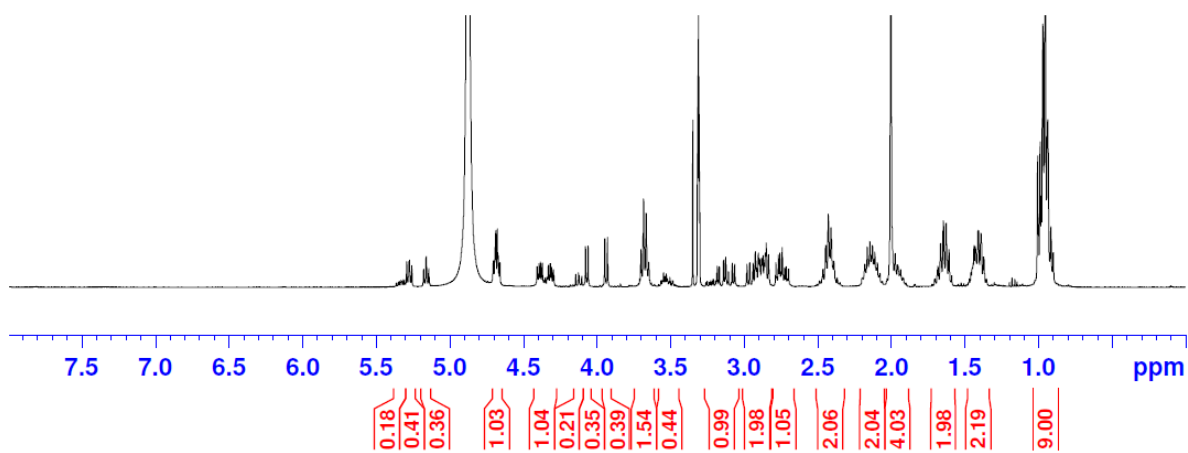
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17d** in CD<sub>3</sub>OD.





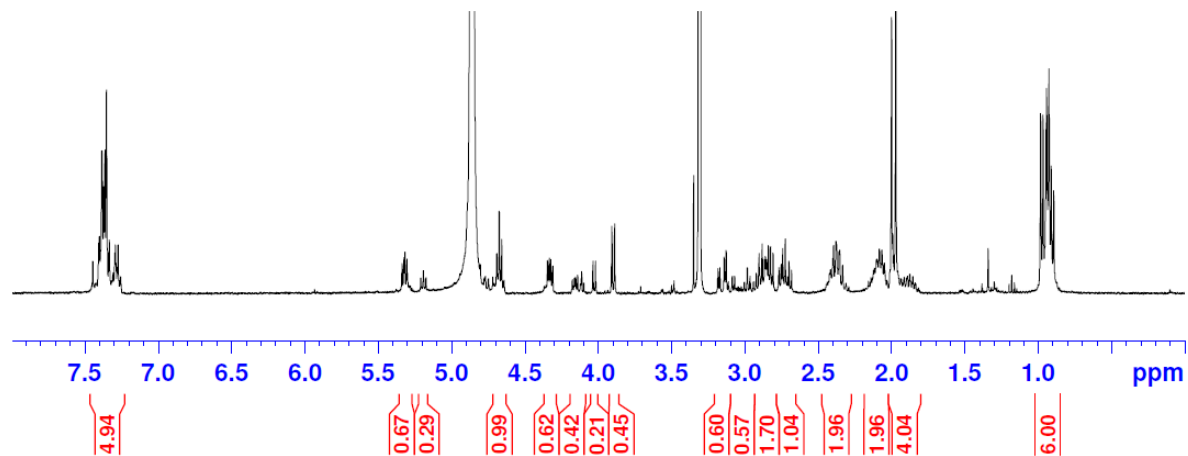
HRMS (ESI)  $m/z$  (M+H)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>27</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 648.2493, found 648.2483.

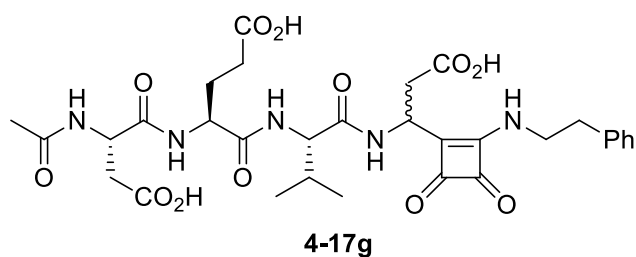
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17e** in CD<sub>3</sub>OD.



HRMS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup>calcd for [C<sub>30</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>-H]<sup>-</sup> 658.2366, found 658.2385.

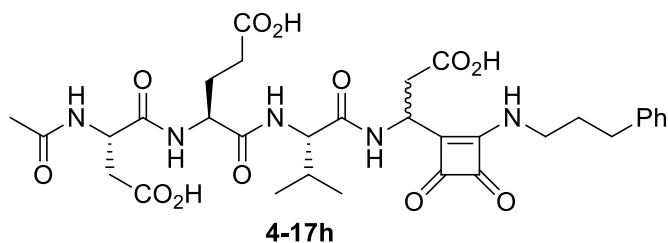
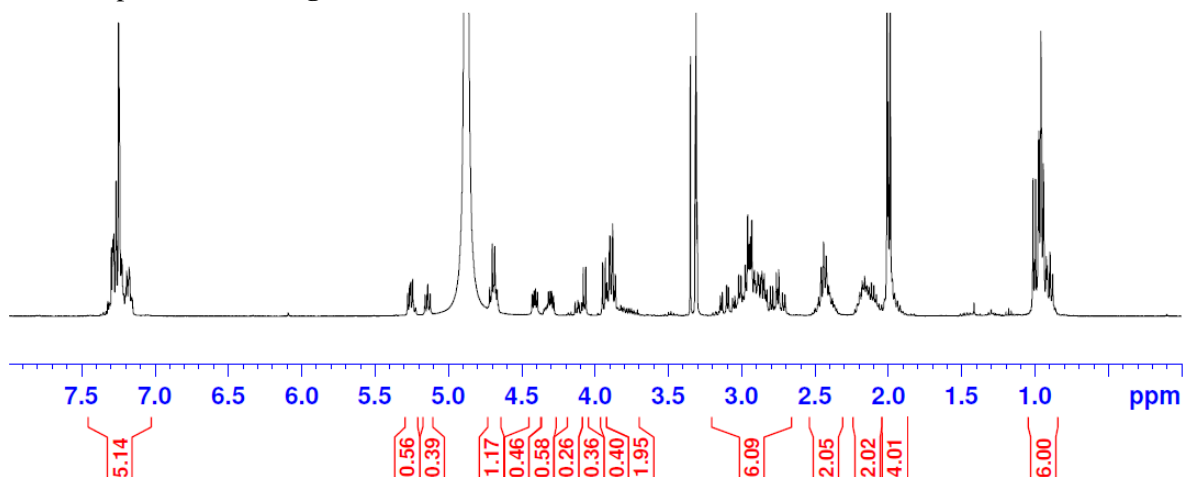
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17f** in CD<sub>3</sub>OD.





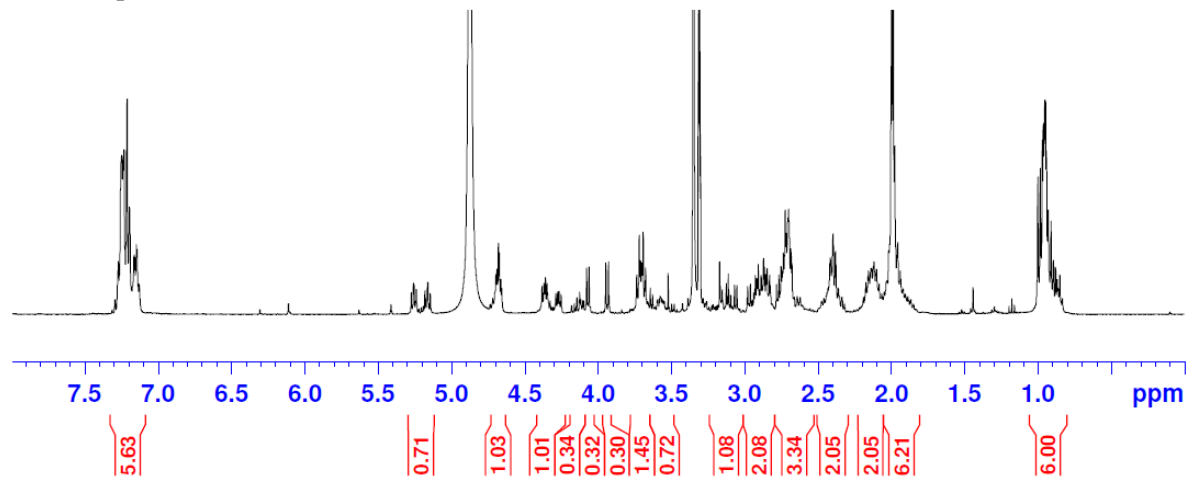
HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>31</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 696.2493, found 696.2493.

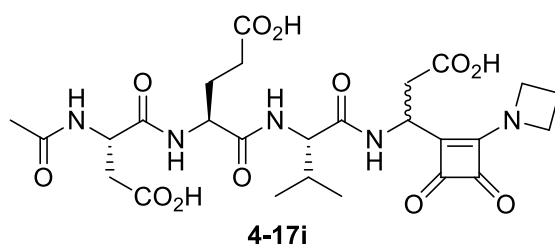
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17g** in CD<sub>3</sub>OD.



HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>32</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 710.2649, found 710.2635.

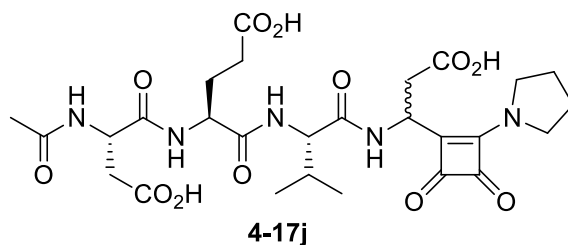
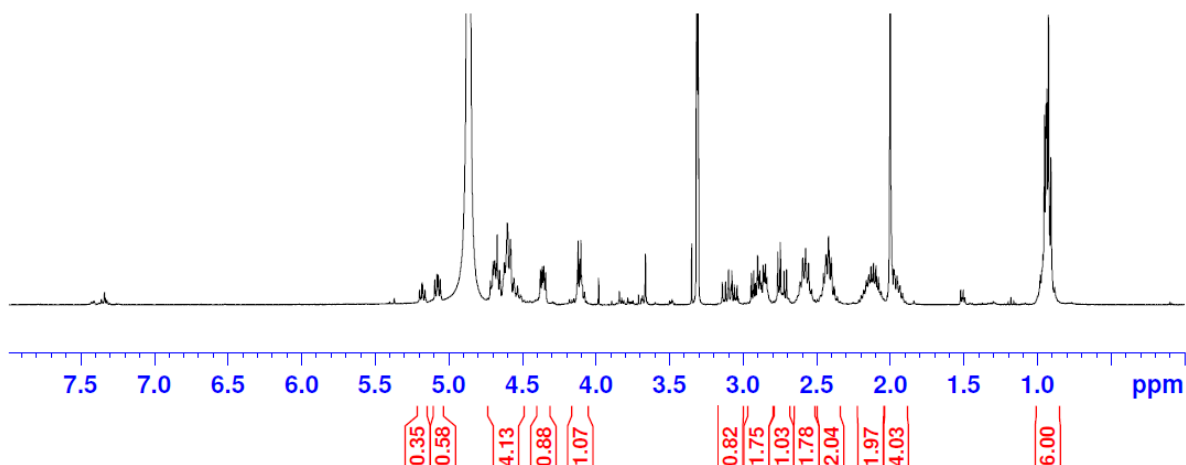
<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17h** in CD<sub>3</sub>OD.





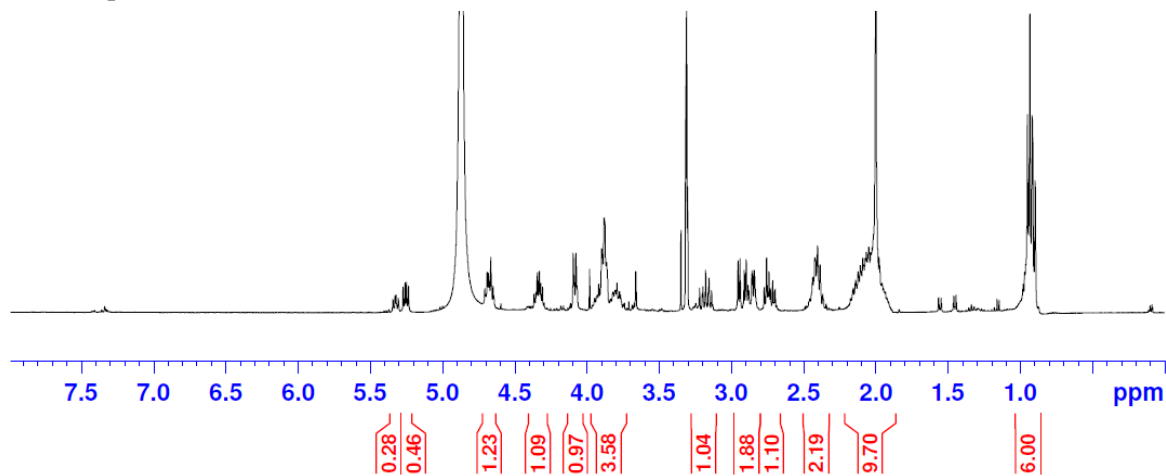
HRMS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>-</sup> calcd for [C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>-H]<sup>-</sup> 608.2209, found 608.2234.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17i** in CD<sub>3</sub>OD.



HRMS (ESI)  $m/z$  (M-H)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>27</sub>H<sub>37</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 646.2336, found 646.2353.

<sup>1</sup>H NMR spectrum of **4-17j** in CD<sub>3</sub>OD.



### **Caspase-3, 7 inhibition assay.**

Caspase-3, 7 inhibition assays were performed using caspase-3 or -7 drug screening kit (PromoCell GmbH). In the assay, Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AFC (AFC, 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin) was employed as peptide substrate. Active caspase-3 or -7 cleaves the substrate to release free AFC with fluorescent. The level of inhibition of caspase activity can be determined by comparison of the fluorescence intensity in samples with and without the testing inhibitors.

5  $\mu\text{L}$  of active caspase-3 or -7 were added to 50  $\mu\text{L}$  of the tested inhibitors at various concentrations and the mixtures were mixed well for 10 min to pre-incubate. To the mixtures was added 50  $\mu\text{L}$  of Ac-Asp-Glu-Val-Asp-AFC in 2X reaction buffer containing 10 mM DTT (final concentration of substrate: 50  $\mu\text{M}$ ). The mixture was incubated at 37 °C for 0.5 h. The release of AFC was monitored by 96-well plate reader using an excitation wavelength of 405 nm and an emission wavelength of 510 nm. Inhibitors stock solutions were prepared in DMSO, and tested inhibitors samples (2% DMSO in H<sub>2</sub>O solution) were made by dilution of DMSO solution using hyperpure water. Control was performed using 50  $\mu\text{L}$  of 2% DMSO in hyperpure water instead of inhibitor. Ac-DEVD-CHO was used as a positive control. IC<sub>50</sub> values were determined by non-linear regression analysis.

## **References for Chapter 4**

- 1) Nicholson, D. W.; Thornberry, N.A. *Trends Biochem. Sci.* **1997**, *22*, 299.
- 2) Thornberry, N. A.; Rano, T. A.; Peterson, E. P.; Rasper, D. M.; Timkey, T.; Garcia-Calvo, M.; Houtzager, V. M.; Nordstrom, P. A.; Roy, S.; Vaillancourt, J. P.; Chapman, K. T.; Nicholson, D. W. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17907.
- 3) (a) Han, B. H.; Xu, D.; Choi, D.; Han, Y.; Xanthoudakis, S.; Roy, S.; Tam, J.; Vaillancourt, J.; Colucci, J.; Siman, R.; Giroux, A.; Robertson, G. S.; Zamboni, R.; Nicholson, D. W.; Holtzman, D. M. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 30128. (b) Xu, J.; Chen, S.; Ku, G.; Ahmed, S. H.; Xu, J.; Chen, H.; Hsu, C. Y. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* **2001**, *21*, 702. (c) Gervais, F. G.; Xu, D.; Robertson, G. S.; Vaillancourt, J. P.; Zhu, Y.; Huang, J. Q.; LeBlanc, A.; Smith, D.; Rigby, M.; Shearman, M. S.; Clarke, E. E.; Zheng, H.; Van Der Ploeg, L. H. T.; Ruffolo, S. C.; Thornberry, N. A.; Xanthoudakis, S.; Zamboni, R. J.; Roy, S.; Nicholson, D. W. *Cell* **1999**, *97*, 395.
- 4) Rathmell, J. C.; Thompson, C. B. *Annu. Rev. Immunol.* **1999**, *17*, 781.
- 5) (a) Wolf, B. B.; Green, D. R. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 20049. (b) Walker, N. P. C.; Talanian, R. V.; Brady, K. D.; Dang, L. C.; Bump, N. J.; Ferenza, C. R.; Franklin, S.; Ghayur, T.; Hackett, M. C.; Hammill, L. D.; Herzog, L.; Hugunin, M.; Houy, W.; Mankovich, J. A.; McGuinness, L.; Orlewicz, E.; Paskind, M.; Pratt, C. A.; Reis, P.; Summani, A.; Terranova, M.; Welch, J. P.; Xiong, L.; Möller, A.; Tracey, D. E.; Kamen, R.; Wong, W. W. *Cell* **1994**, *78*, 343.
- 6) (a) Rudolph, K.; Gerwin, N.; Verzijl, N.; van der Kraan, P.; van den Berg, W. *Osteoarthritis Cartilage.* **2003**, *11*, 738. (b) Siegmund, B.; Zeitz, M. *IDrugs.* **2003**, *6*, 154.
- 7) Wannamaker, W.; Davies, R.; Namchuk, M.; Pollard, J.; Ford, P.; Ku, G.; Decker, C.; Charifson, P.S.; Weber, P.; Charifson, P.; Germann, U. A.; Kuida, K. et al. *J Pharmacol Exp Ther.* **2007**, *321*, 509.
- 8) (a) Linton, S. D.; Aja, T.; Armstrong, R. A.; Bai, X.; Chen, L. S.; Chen, N.; Ching, B.; Contreras, P.; Diaz, J. L.; Fisher, C. D.; Fritz, L. C. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6779. (b) Pockros, P.; Schiff, E.; Shiffman, M.; McHutchison, J.; Gish, R.; Afdhal, N.; Makhviladze, M.; Huyghe, M.; Hecht, D.; Oltersdorf, T.; Shapiro, D. *Hepatology.* **2007**, *46*, 324. (c) Baskin-Bey, E.; Washburn, K.; Feng, S.; Oltersdorf, T.; Shapiro, D.; Huyghe, M.; Burgart, L.; Garrity-Park, M.; van Vilsteren, F.; Oliver, L.; Rosen, C. *Am J Transplant.* **2007**, *7*, 218.
- 9) Chereau, D.; Kodandapani, L.; Tomaselli, K. J.; Spada, A. P.; Wu, J. C. *Biochemistry* **2003**, *42*, 4151.
- 10) Wilson, K. P.; Black, J. F.; Thomson, J. A.; Kim, E. E.; Griffith, J. P.; Navia, M. A.; Murcko, M. A.; Chambers, S. P.; Aldape, R. A.; Raybuck, S. A.; Livingston, D. J. *Nature* **1994**, *370*, 270.
- 11) Powers, J. C.; Asgian, J. L.; Ekici, O. D.; James, K. E. *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639.
- 12) Shinada, T.; Yamasaki, A.; Kuniwa, Y.; Shimamoto, K.; Ohfune, Y. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 4354.

- 13) Kumar, S. P.; Glória, P. M. C.; Gonçalves, L. M.; Gut, J.; Rosenthal, P. J.; Moreira, R.; Santos, M. M. *Med. Chem. Comm.* **2012**, *3*, 489.
- 14) (a) Becker, J. W.; Rotonda, J.; Soisson, S. M.; Aspiotis, R.; Bayly, C.; Francoeur, S.; Gallant, M.; Garcia-Calvo, M.; Giroux, A.; Grimm, E.; Han, Y.; McKay, D.; Nicholson, D. W.; Peterson, E.; Renaud, J.; Roy, S.; Thornberry, N.; Zamboni, R. *J. Med. Chem.*, **2004**, *47*, 2466. (b) Grimm, E. L.; Roy, B.; Aspiotis, R.; Bayly, C. I.; Nicholson, D. W.; Rasper, D. M.; Renaud, J.; Roy, S.; Tam, J.; Tawa, P.; Vaillancourt, J. P.; Xanthoudakis, S.; Zamboni, R. *J. Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 845.
- 15) Yoshimori, A.; Takasawa, R.; Tanuma, S. *BMC Pharmacology* **2004**, *4*, 7.

## 第五章 $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸類の合成とペプチド化

$\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノ酸 **5-1** は天然の生理活性ペプチドの構成要素としてしばしば見られるアミノ酸である。(Figure 5-2)。<sup>1-3)</sup> **5-1** のアナログとして  $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸 **5-2** の合成を着想した(Figure 5-1)。**5-2** の合成は報告されていないため、まずその合成法の確立に取り組んだ。

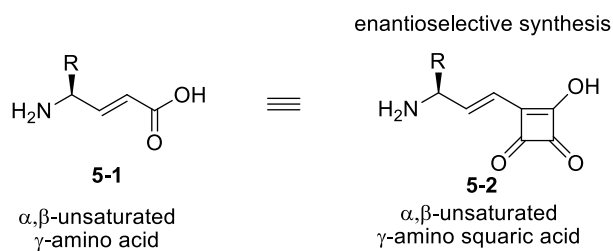


Figure 5-1. Novel squaric acid derivative.

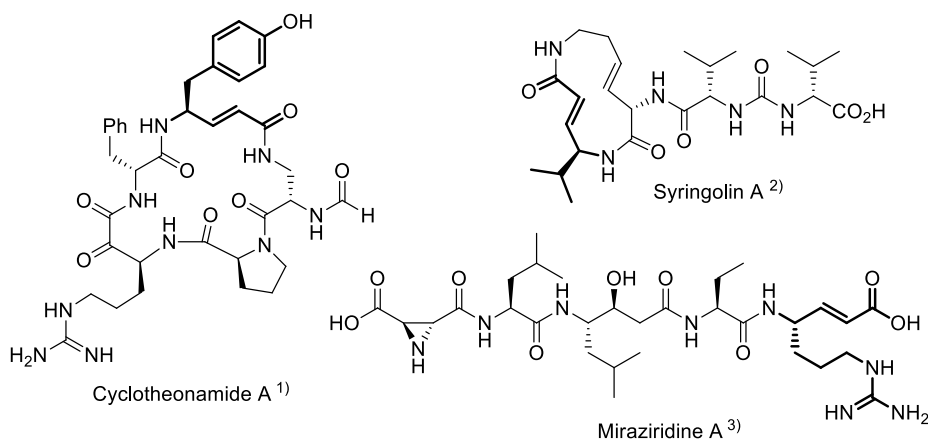
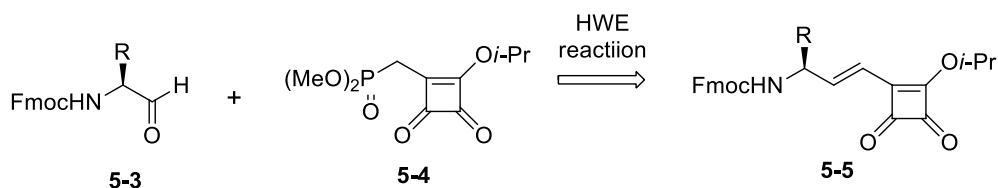


Figure 5-2.  $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -amino acid-containing natural bioactive peptides.

### 5-1. $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸の合成

$\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸は、アミノアルデヒド **5-3** と  $\alpha$ -Sq ホスホネート **5-4** の Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) 反応によって合成できると考えた。両端へのペプチド鎖の導入や固相合成への適用を視野に入れて、Fmoc 体 **5-5** の合成を行うことにした(Scheme 5-1)。

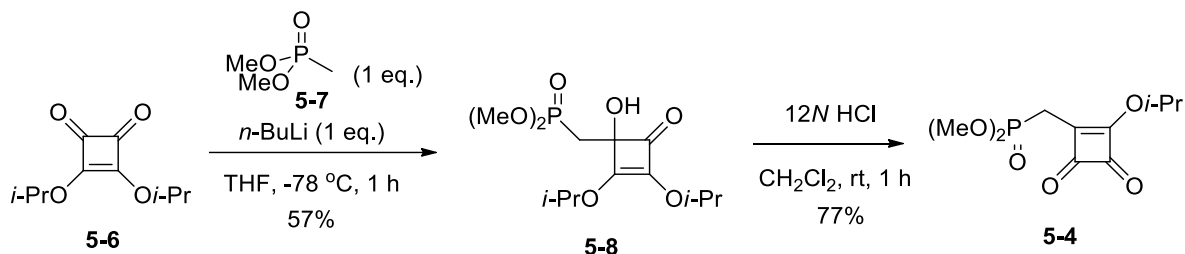


Scheme 5-1.



## カップリング前駆体の合成

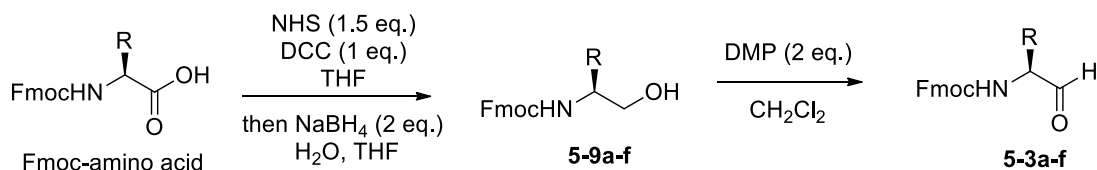
$\alpha$ -Sq ホスホネート **5-4** の合成は、Perez らの類似化合物の合成法に従って行った(Scheme 5-2)。<sup>4)</sup> SqA ジエステル **5-6** に対してジメチルメチルホスホネート **5-7** を 1,2-付加させ **5-8** とし、続く塩酸処理によって **5-4** へと導いた。



Scheme 5-2.

**5-4** のカップリングパートナーとなる Fmoc-アミノアルデヒド **5-3** の合成は、既知の手法により合成した(Table 5-1)。<sup>5)</sup> 6 種類の Fmoc-アミノ酸を出発原料として用い、カルボキシル基のスクシンイミド体への活性化と、続く NaBH<sub>4</sub>による還元よりアミノアルコール **5-9a-f** を得た。**5-9a-f** の Dess-Martin 酸化によって 6 種類のアミノアルデヒド **5-3a-f** を合成した。アミノアルデヒド **5-3** は精製せずに、そのまま次の HWE 反応に用いた。

Table 5-1.



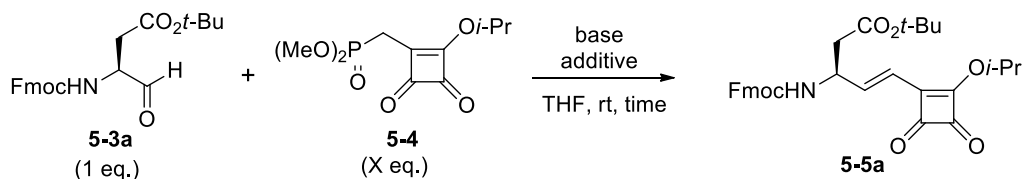
N-Fmoc amino acid	yield of <b>5-9</b> (%)
Fmoc-Asp(Ot-Bu)-OH	99 ( <b>5-9a</b> )
Fmoc-Leu-OH	71 ( <b>5-9b</b> )
Fmoc-Phe-OH	88 ( <b>5-9c</b> )
Fmoc-Tyr(t-Bu)-OH	95 ( <b>5-9d</b> )
Fmoc-Glu(Ot-Bu)-OH	99 ( <b>5-9e</b> )
Fmoc-His(Trt)-OH	52 ( <b>5-9f</b> )

## HWE 反応の条件検討

HWE 反応の条件を Asp 由来のアミノアルデヒド **5-3a** を用いて精査した(Table 5-2)。アミノアルデヒド **5-3a** がエピメリ化しやすいことを考慮し、最初塩基にはマイルドな炭酸ナトリウムを用いて **5-4** との反応を試みた。しかし、望む生成物 **5-5a** は 33% と低収率であった(entry 1)。またキラルカラムを用いた解析から 73% ee であることがわかった。この結果は、反応速度が遅いため、徐々にアルデヒド **5-3a** のエピメリ化が生じたと考えられる。そこで

非可逆な脱プロトン化を行うため水素化ナトリウムを用いたところ、収率は 43% と低いながらも、93% ee で望む **5-5a** を得ることができた(entry 2)。収率の改善に向けてホスホネート **5-4** を 1.5 当量用いたところ、収率が 66% まで改善された(entry 3)。しかし、ホスホネート **5-4** と水素化ナトリウムから生じたカルボアニオンの溶解性が低く、懸濁液となっていた。そのため 15-クラウンエーテルを添加したところ、反応が加速され、73% 収率 93% ee で望む Fmoc 体 **5-5a** を得ることができた (entry 4)。

**Table 5-2.**

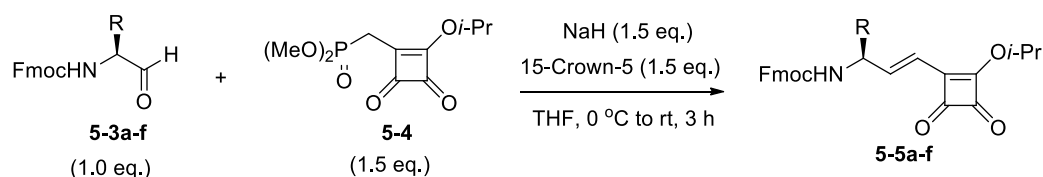


entry	X	base (eq.)	additive (eq.)	time (h)	yield (%) from <b>5-9a</b>	ee (% ee)
1	1	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (1)	-	24	38	73
2	1	NaH (1)	-	6	43	93
3	1.5	NaH (1.5)	-	5	66	-
4	1.5	NaH (1.5)	15-crown-5 (1.5)	2	73	93

### アミノアルデヒドの一般性調査

Asp 由来のアミノアルデヒド **5-3a** に対する HWE 反応の条件を最適化できたところで、次は他のアミノ酸由来のアミノアルデヒド **5-3b-f** を用いて  $\alpha,\beta$ -不飽和 $\gamma$ -アミノスクアリン酸 **5-5b-f** の合成を試みた(Table 5-3)。その結果、**5-3b-f** と **5-4** の HWE 反応により 45-69% 収率で **5-5b-f** を得ることができ、**5-5a** と合わせて 6 種類の Fmoc- $\alpha,\beta$ -不飽和 $\gamma$ -アミノスクアリン酸の合成に成功した。

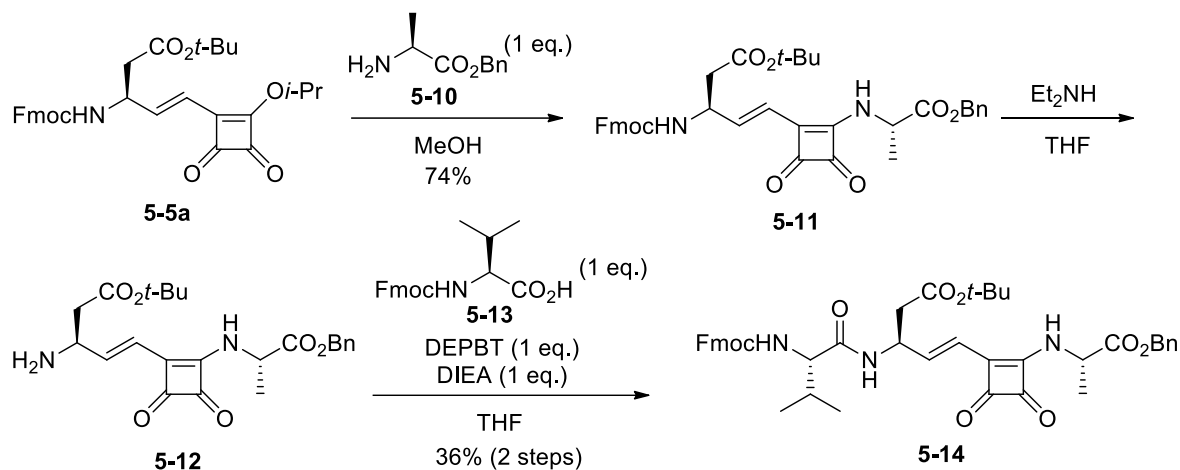
**Table 5-3.**



R	yield (%) from <b>5-9</b>	R	yield (%) from <b>5-9</b>
CO <sub>2</sub> t-Bu (Asp)	73 ( <b>5-5a</b> )	p-Tyr (Tyr)	61 ( <b>5-5d</b> )
Leu (Leu)	57 ( <b>5-5b</b> )	Glu (Glu)	69 ( <b>5-5e</b> )
Phe (Phe)	67 ( <b>5-5c</b> )	His (His)	45 ( <b>5-5f</b> )

## 両端へのアミノ酸の導入

Fmoc 体 **5-5a** を用いてペプチドへの組み込みを行った (Scheme 5-3)。 **5-5a** に対して H-Ala-OBn **5-10** をメタノール中で処理することで、縮合体 **5-11** を 74% 収率で得た。続いて、Et<sub>2</sub>NH を用いて Fmoc 基を脱保護してフリーアミン **5-12** とした後、N 末端のフリーアミンに Fmoc-Val-OH **5-13** を縮合することにより **5-14** を合成し、**5-5a** のペプチド内への組み込みに成功した。

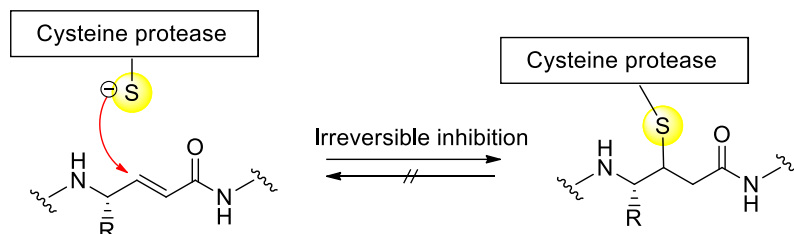
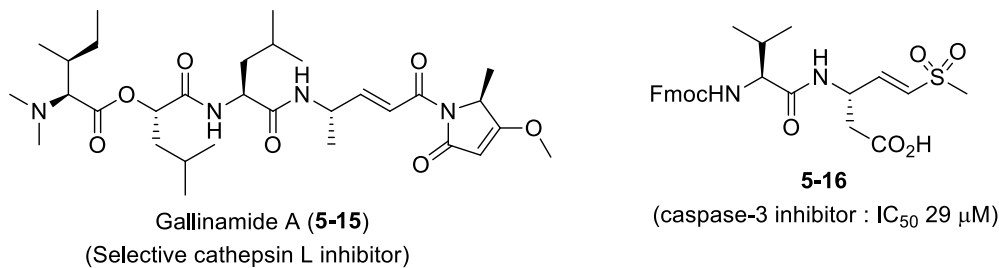


Scheme 5-3.

## 5-2. Caspase-3 阻害剤としての利用

新規な $\alpha,\beta$ -不飽和アミノスクアリン酸の合成が確立できたので、次にその生物活性に及ぼす有効性を評価することにした。具体的には $\alpha,\beta$ -不飽和 $\gamma$ -アミノスクアリン酸を導入した Caspase-3 阻害ペプチドアナログの合成と活性評価を検討した。

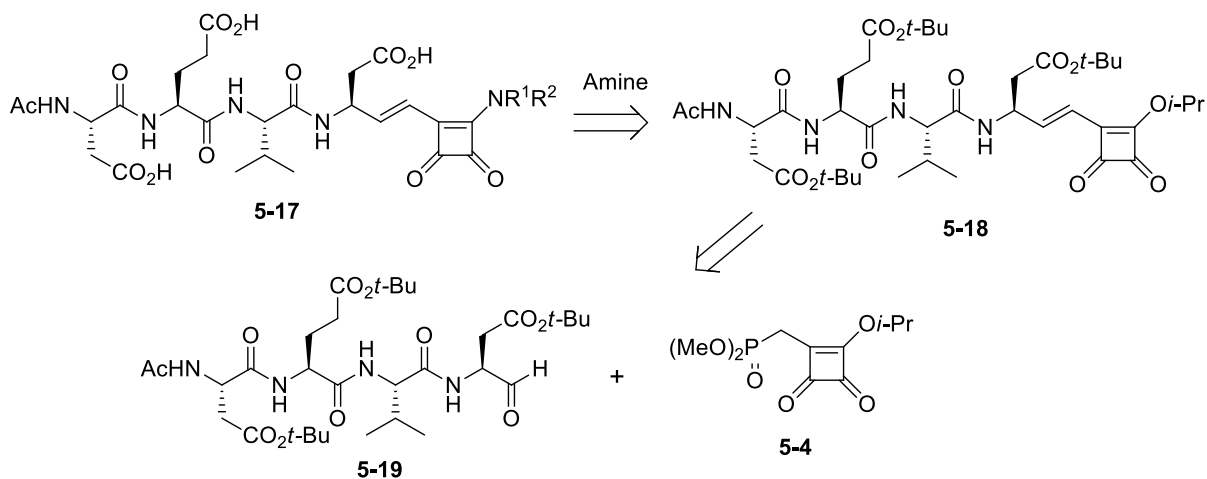
マイケルアクセプター部位を含むペプチドには、システインプロテアーゼを阻害する活性をもつものが知られている (Figure 5-3)。例えば、 $\alpha,\beta$ -不飽和アミノ酸を有する天然物 Gallinamide A (**5-15**) はパナマのカリブ海沿岸のシアノバクテリア由来のデプシペプチドであり、選択的なカテプシン L 阻害剤である。<sup>6)</sup> また、Santos らはビニルスルホンを有するジペプチドアナログ **5-16** を Caspase-3 の阻害剤として合成し、 $\mu\text{M}$  レベルでの活性を報告している。<sup>7)</sup> これらは、システインプロテアーゼの活性部位のチオール基と共有結合を介して結合する不可逆的阻害であることが研究により示されている。<sup>6a, 7)</sup>



**Figure 5-3.** Michael acceptor as cysteine protease inhibitor.

### Caspase-3 阻害剤の合成計画

第四章における  $\alpha$ -Asq を利用した Caspase-3 阻害剤と同様の分子設計により、 $\alpha,\beta$ -不飽和  $\gamma$ -アミノスクアリン酸を Caspase-3 の認識アミノ酸配列の C 末端に導入した **5-17** を合成することにした。また、C 末端部の構造-活性相関研究として、共通中間体 **5-18** に対して種々のアミンを導入したいいくつかの誘導体合成を想定した。**5-18** はテトラペプチドアルデヒド **5-19** とホスホネート **5-4** のカップリングによって合成できると考えた(Scheme 5-4)。

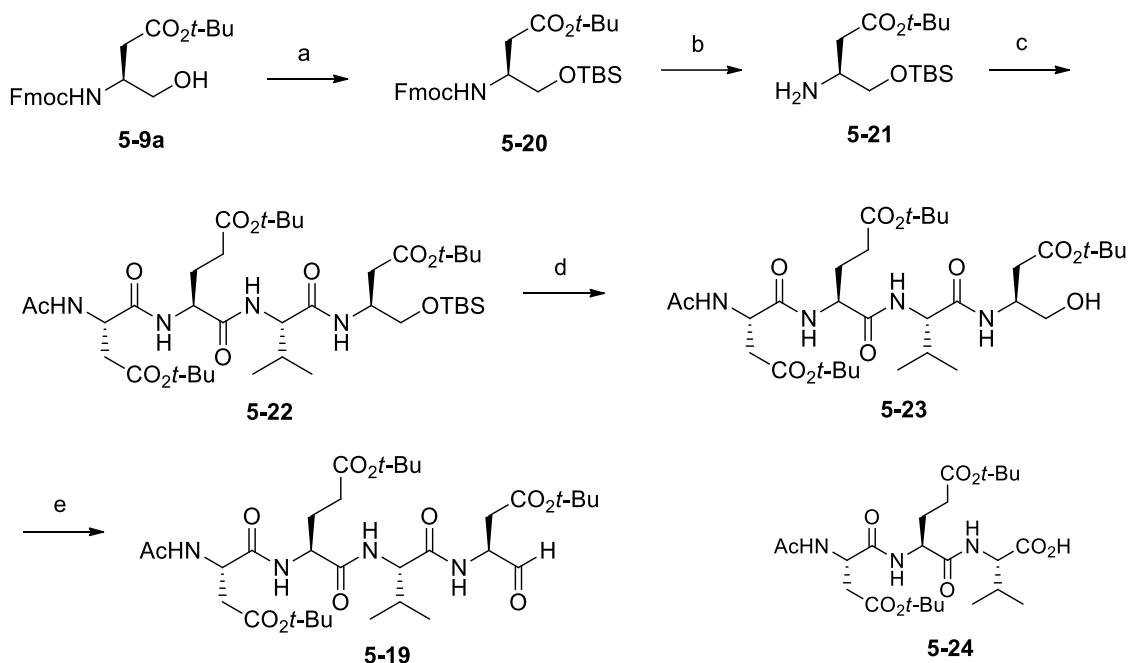


**Scheme 5-4.**

### テトラペプチドアルデヒド **5-19** の合成

テトラペプチドアルデヒド **5-19** の合成を行った(Scheme 5-5)。アミノアルコール **5-9a** を出発原料として、アルコールを TBS 基で保護して **5-20** とした。Fmoc 基を脱保護して **5-21** とした後、トリペプチド **5-24** との縮合により **5-22** とした。**5-22** の TBS 基を脱保護してアルコール **5-23** とした後、Dess-Martin 酸化によってペプチドアルデヒド **5-19** を合成でき

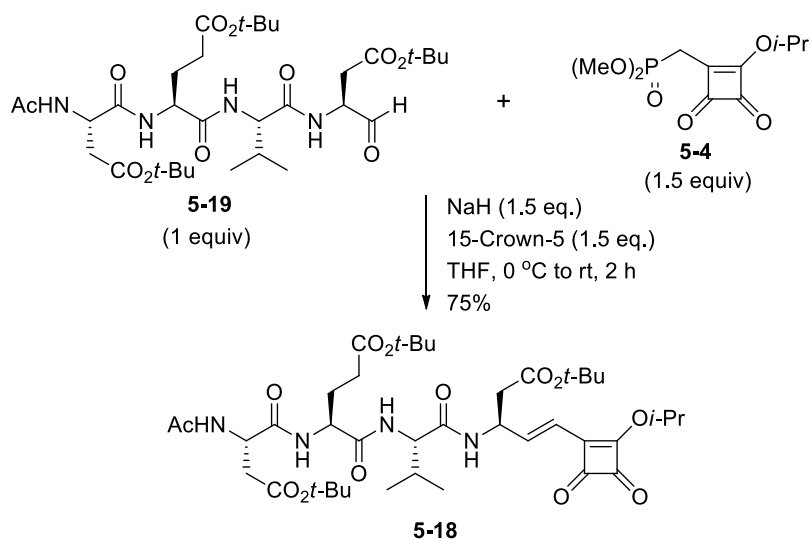
た。



**Scheme 5-5.** (a) TBSCl (1.2 eq.), imidazole (2.5 eq.), DMF, rt, 2 h, 97%; (b) 40% Et<sub>2</sub>NH/THF, rt, 6 h, 73%; (c) **5-24** (1 eq.), DEPBT (2 eq.), Et<sub>3</sub>N (2 eq.), THF, 0 °C to rt, 2 h, 77%; (d) TBAF (2 eq.), AcOH (2 eq.), DMF, rt, 14 h, 91%; (e) Dess-Martin Periodinane (2 eq.), CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, rt, 2 h, 98%.

#### 共通中間体の合成

テトラペプチドアルデヒド **5-19** とホスホネート **5-4** の HWE 反応により、カップリング体 **5-18** を 75% 収率で得ることができた(Scheme 5-6)。













**Scheme 5-6.**

### テトラペプチドアナログ **5-17** の合成

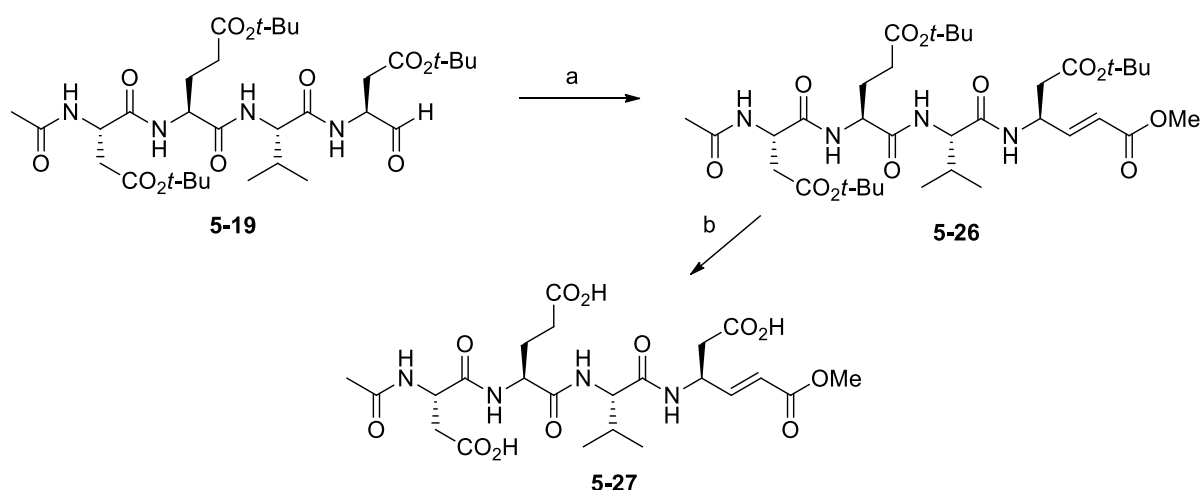
**5-18** に対して、一級アルキルアミン、一級フェニルアルキルアミン、環状二級アミン合わせて 10 種類のアミンとの反応を行ったところ、Sq-アミド **5-25a-j** を高収率で得た。最後に、**5-25** を TFA で処理することにより、**5-17a-j** を合成できた。

**Table 5-3.**

entry	amine	yield of <b>5-25</b> (%)	yield of <b>5-17</b> (%)
1		82 ( <b>5-25a</b> )	97 ( <b>5-17a</b> )
2		86 ( <b>5-25b</b> )	99 ( <b>5-17b</b> )
3		82 ( <b>5-25c</b> )	88 ( <b>5-17c</b> )
4		82 ( <b>5-25d</b> )	74 ( <b>5-17d</b> )
5		80 ( <b>5-25e</b> )	93 ( <b>5-17e</b> )
6		95 ( <b>5-25f</b> )	98 ( <b>5-17f</b> )
7		91 ( <b>5-25g</b> )	99 ( <b>5-17g</b> )
8		77 ( <b>5-25h</b> )	93 ( <b>5-17h</b> )
9		95 ( <b>5-25i</b> )	91 ( <b>5-17i</b> )
10		97 ( <b>5-25j</b> )	91 ( <b>5-17j</b> )

### $\alpha,\beta$ -不飽和エステル **5-27** の合成

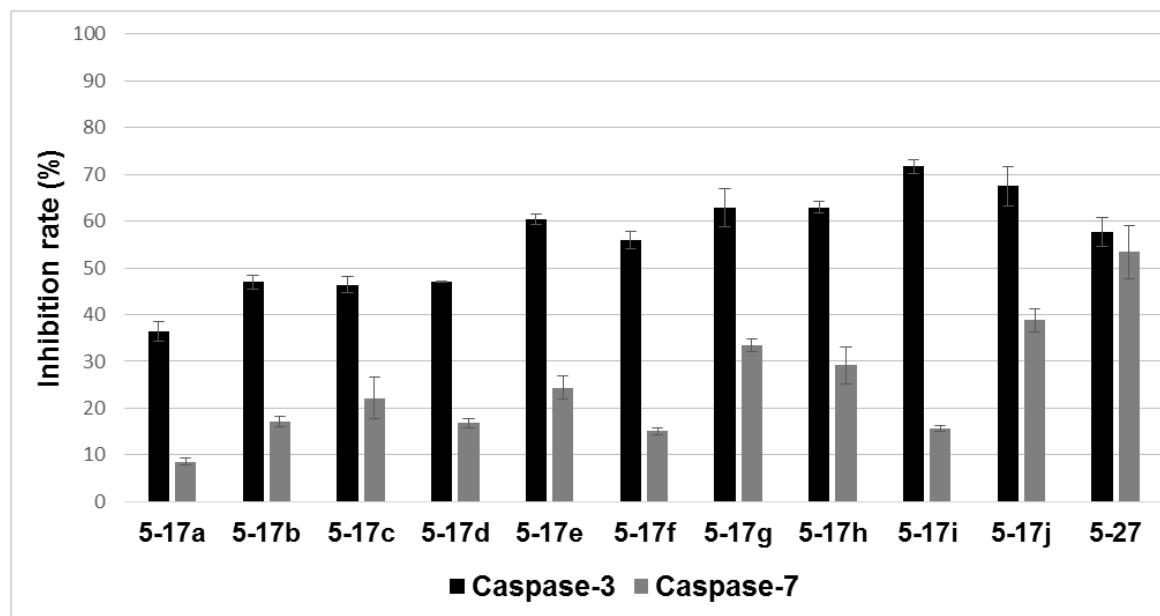
$\alpha,\beta$ -不飽和エステルはシステインプロテアーゼの不可逆的阻害剤として利用されている。<sup>8)</sup> **5-17** の Sq 基の効果を探るため、活性の比較対象として、C 末端を  $\alpha,\beta$ -不飽和エステルとしたペプチド **5-27** の合成を行った (Scheme 5-7)。ペプチドアルデヒド **5-19** とトリメチルホスホノ酢酸の HWE 反応により **5-26** とした後、TFA で処理することによって **5-27** を合成できた。



**Scheme 5-7.** (a) Trimethyl phosphonoacetate (1 eq.), NaH (1 eq.), THF, 0 °C to rt, 2 h, 65%; (b) TFA, rt, 10 min, 88%.

#### Caspase-3, 7 に対する阻害活性スクリーニング

合成した Sq-アミド **5-17a-j** および  $\alpha,\beta$ -不飽和エステル **5-27** の 11 種のペプチドについて 10 nM の濃度における Caspase-3 および Caspase-7 に対する阻害率を算出した(Figure 5-4)。その結果、Sq-アミド **5-17a-j** は Caspase-3 に対して 36-71%の阻害率を示し、Caspase-7 に対しては 8-38%の阻害率を示した。これにより、Caspase-3 に対してより強い阻害率を示すことがわかった。 $\alpha,\beta$ -不飽和エステル **5-27** は活性測定濃度の 10 nM において、Caspase-3 と Caspase-7 に対する阻害率は同程度であった。

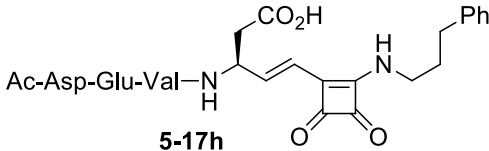
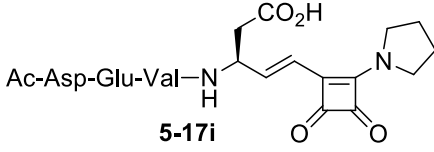
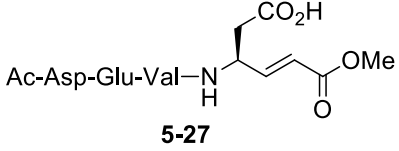
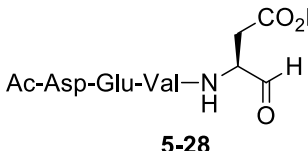


**Figure 5-4.** Inhibition screening of **5-17a-j** and **5-27** at 10 nM toward caspase-3 and caspase-7.

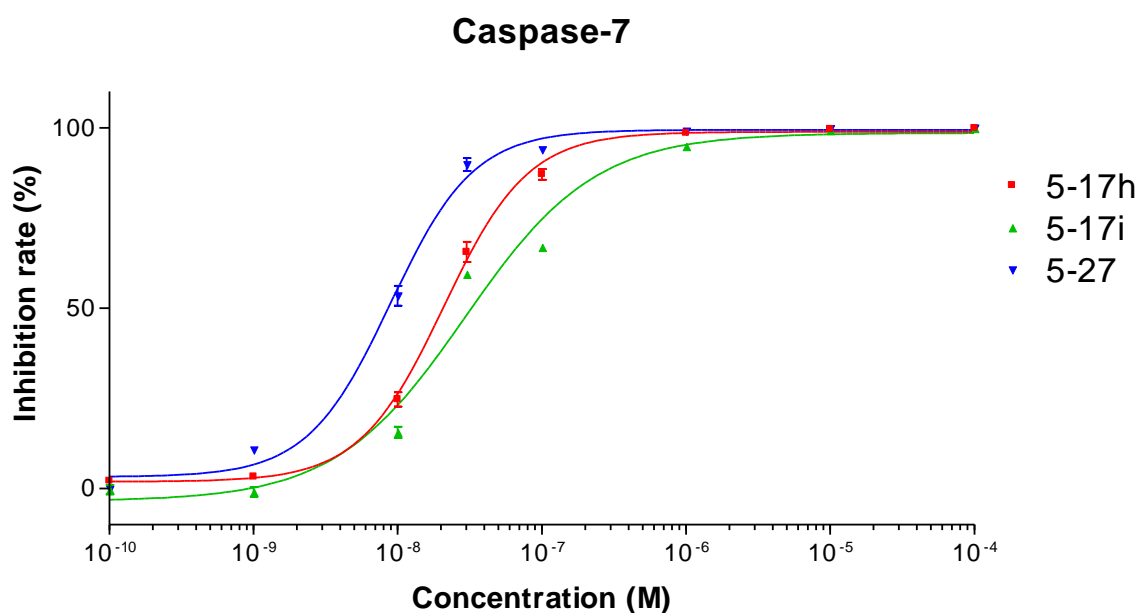
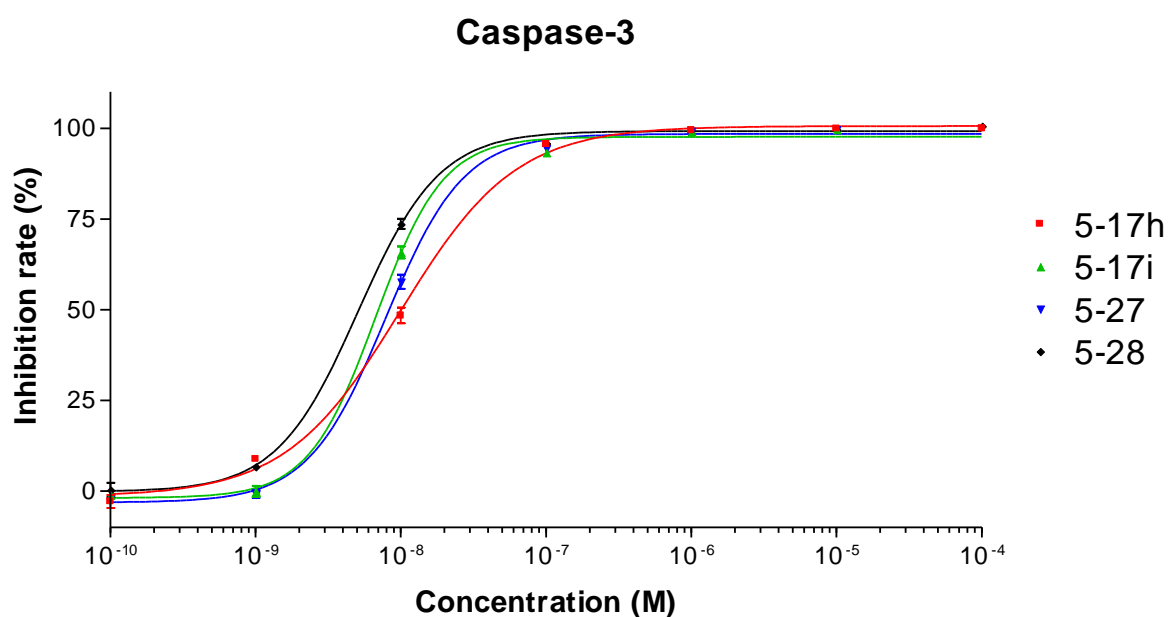
スクリーニングから強い阻害活性を示した Sq-アミド **5-17h**、**5-17i** および  $\alpha,\beta$ -不飽和エス

テル **5-27** について、Caspase-3 および Caspase-7 に対する IC<sub>50</sub> 値の算出を行った(Table 5-4)。その結果、**5-17h**、**5-17i** の Caspase-3 に対する IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ 9.9 nM、6.8 nM であり、既知のペプチドアルデヒド **5-28**<sup>9)</sup> と同程度の阻害活性を示した。また、 $\alpha,\beta$ -不飽和エステル **5-27** の Caspase-3 に対する IC<sub>50</sub> 値は 7.9 nM であり、その活性は **5-17h**、**5-17i** と同程度であった。一方で、Caspase-7 に対する阻害活性は **5-17h**、**5-17i** がそれぞれ 21 nM および 29 nM であり、Caspase-3 に対する阻害活性に比べて 2~4.3 倍低下したのに対し、**5-27** の Caspase-7 に対する阻害活性は 8.9 nM と Caspase-3 に対する阻害活性とほぼ同等であった。この結果から、Sq-アミド **5-17h**、**5-17i** の Caspase-3 の Caspase-7 に対する活性比は **5-27** の 2~4 倍程度であることがわかった。詳細な解析を行う必要があるものの、上記の結果は C 末端へのアミンの導入により、阻害の選択性をさらに高める可能性があることを示唆している。

**Table 5-4.**

inhibitor	IC <sub>50</sub> (nM)		IC <sub>50</sub> Caspase-7/-3
	Caspase-3	Caspase-7	
 <b>5-17h</b>	9.93 ± 0.620	20.8 ± 1.18	2.09
 <b>5-17i</b>	6.71 ± 0.511	29.4 ± 3.86	4.38
 <b>5-27</b>	7.88 ± 0.368	8.93 ± 0.586	1.13
 <b>5-28</b>	5.10 ± 0.286 ref. 1.3	- 2.9	-

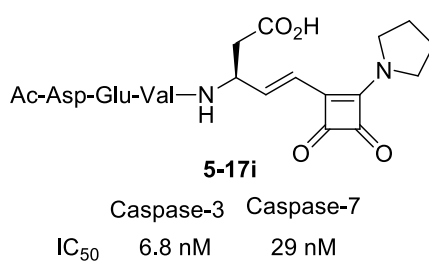
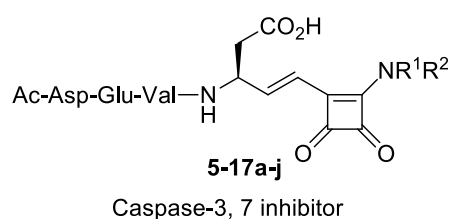
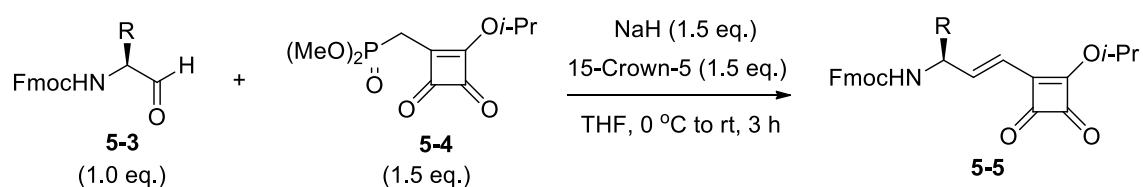




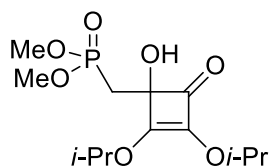
## 第五章まとめ

本章ではスクアリン酸から誘導した新規なアミノ酸ユニットとして、 $\alpha,\beta$ -不飽和 $\gamma$ -アミノスクアリン酸の合成とペプチド化について述べた。Fmoc 体 **5-5** の合成は光学活性なアミノアルデヒド **5-3** と  $\alpha$ -Sq ホスホネート **5-4** の HWE 反応により、光学活性体として合成することができた。Fmoc 体 **5-5a** からの Sq-エステル側およびアミノ基側のアミノ酸の導入によ

ってペプチド化にも成功した。また、 $\alpha,\beta$ -不飽和 $\gamma$ -アミノスクアリン酸のチオールアクセプターとしての性質を利用した Caspase-3 阻害剤の開発を行った。C 末端部の置換基の異なる 10 種類の Sq-アミド **5-17a-j** を合成した結果、**5-17i** は Caspase-3 に対して  $IC_{50}$  値 6.8 nM の活性を示すことがわかった。この活性はペプチドアルデヒド **5-28** と同程度であった。この阻害剤の阻害メカニズム(可逆あるいは不可逆)については現在調査している。



### Dimethyl ((1-hydroxy-2,3-diisopropoxy-4-oxocyclobut-2-en-1-yl)methyl)phosphonate (**5-8**)



To a solution of dimethyl methylphosphonate (0.760 mL, 7.11 mmol) in THF (25 mL) was added *n*-BuLi (2.65 M solution in hexane; 2.68 mL, 7.11 mmol) under argon at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The mixture was stirred for 30 min at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . To the mixture was added diisopropoxy squarate **5-6** (1.34 g, 6.77 mmol) in THF (20 mL) and stirred for 1 h at  $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The mixture was quenched with sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mL) and extracted with EtOAc (10 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-1/5) to give **5-8** (1.25 g, 57%, brsm 80% based on squarate) as a colorless oil:

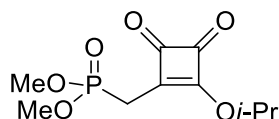
FTIR (neat) 3418, 2980, 1800, 1761, 1616, 1466, 1387, 1375, 1321, 1241, 1189, 1099, 1031, 968  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.87 (sept,  $J = 6.4$  Hz, 2H), 3.79 (d,  $J = 11.2$  Hz, 3H), 3.75 (d,  $J = 11.2$  Hz, 3H), 2.36-2.23 (m, 2H), 1.38 (t,  $J = 7.2$  Hz, 6H), 1.30-1.20 (m, 6H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  183.9, 183.8, 166.1, 166.0, 131.4, 81.83, 81.78, 73.6, 53.2, 53.1, 52.6, 52.5, 29.3, 27.9, 22.7, 22.4, 22.3;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{O}_7\text{P}+\text{Na}]^+$  345.1074, found 345.1074.

### Dimethyl ((2-isopropoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)methyl)phosphonate (**5-4**)



To a solution of **5-8** (1.20 g, 3.73 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) was added 12 *N* HCl (170  $\mu\text{L}$ , 1.87 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 40 min. The mixture was quenched with  $\text{NaHCO}_3$ , and filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 3/1-0/1) to give **5-4** (0.750 g, 77%) as a yellow solid:

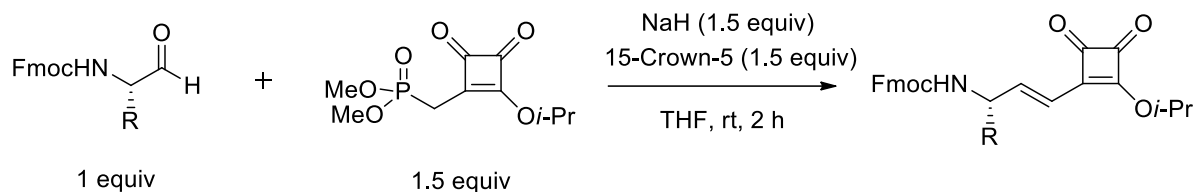
FTIR (neat)  $\text{cm}^{-1}$  3287, 2978, 1772, 1623, 1386, 1375, 1319, 1218, 1188, 1100, 1030, 1007, 965, 801;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.39 (sept,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 3.75 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.13 (d,  $J = 23.2$  Hz, 1H), 1.41 (d,  $J = 6.4$  Hz, 6H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  198.1, 198.0, 193.4, 193.39, 193.1, 193.0, 172.7, 172.6, 79.8, 53.1, 53.0, 22.9, 22.6, 21.6;

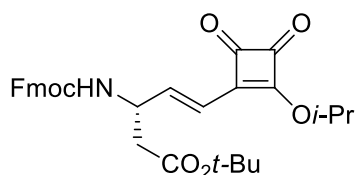
HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{O}_6\text{P}+\text{Na}]^+$  285.0498, found 285.0499.

### General procedure for the synthesis of Fmoc- $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -amino squaric acid (**5-5a-f**)



To a suspension of NaH (0.3 mmol, 1.5 equiv) in THF (1 mL) under argon at 0 °C were added the squaric phosphonate **5-4** (0.3 mmol, 1.5 equiv) in THF (1 mL) and 15-Crown-5 (0.3 mmol, 1.5 equiv). The resulting solution was stirred at room temperature for 30 min. A solution of the amino aldehyde **5-3a-f** (0.2 mmol, 1 equiv) in THF (2 mL) was added and stirred at room temperature for 2 h. The mixture was quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl, and the THF solvent was removed under reduced pressure. The residual aqueous solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc) to give the Fmoc- $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -amino squaric acid **5-5a-f** in the indicated yield:

#### Aspartic acid derivative (**5-5a**)



73% yield, a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3341, 2977, 1788, 1731, 1722, 1628, 1567, 1524, 1409, 1322, 1244, 1153, 1098, 1092, 757 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.70 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.52 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.36 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.25 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.00 (dd,  $J$  = 15.6 Hz, 6.8 Hz, 1H), 6.44 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 5.65 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H), 5.38 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.35 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 2H), 4.16 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 1H), 2.62-2.50 (m, 2H), 1.45-1.35 (m, 15H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  193.6, 192.8, 192.6, 172.8, 169.9, 155.6, 143.7, 143.6, 141.3, 127.7, 127.0, 125.0, 120.0, 116.2, 82.1, 79.8, 67.0, 49.9, 47.1, 39.5, 28.0, 22.8;

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup> calcd for [C<sub>31</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>7</sub>+Na]<sup>+</sup> 554.2149, found 554.2141.

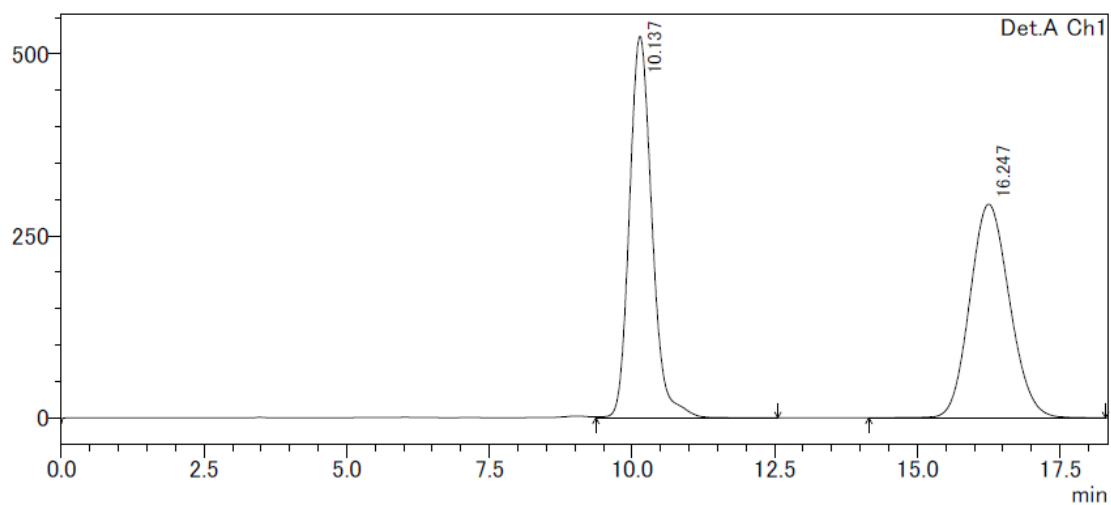
*Determination of the enantiomeric excess of 5-5a by chiral HPLC.*

Column: CHIRALCEL OD-H, 4.6 x 250 mm

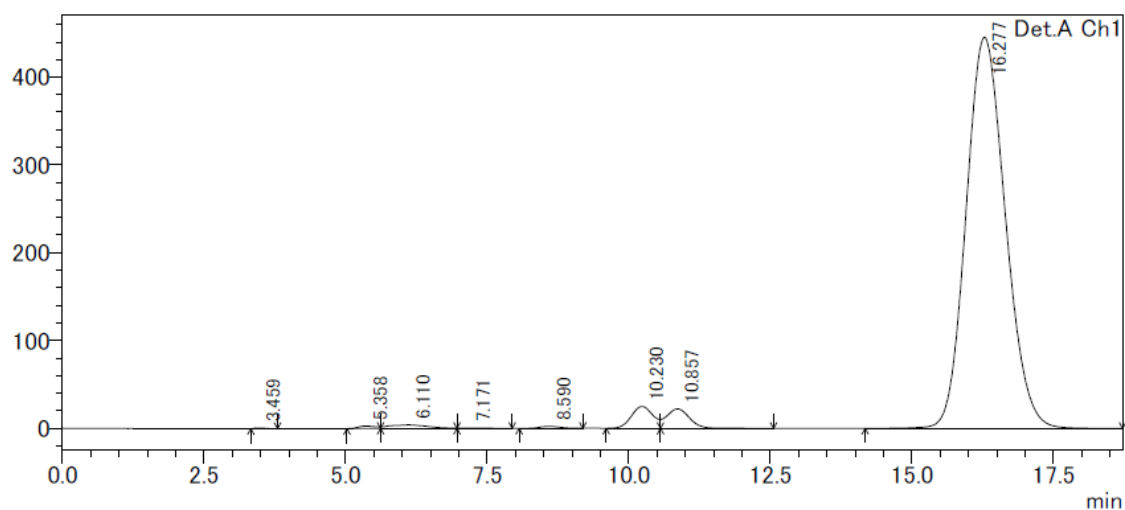
Flow: Iso, 25% EtOH/Hexane 1 mL/min, temp.: 30 °C

Detection: UV 254 nm

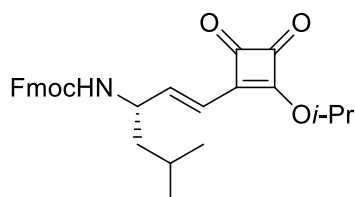
HPLC chart of **rac-5-5a**.



HPLC chart of **5-5a** (93% ee).



**Leucine derivative (5-5b)**



57% yield, a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3340, 2955, 1784, 1744, 1703, 1628, 1574, 1526, 1450, 1400, 1330, 1244, 1095, 1024, 759, 740  $\text{cm}^{-1}$ ;

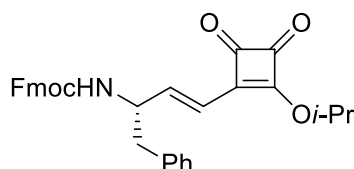
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.76 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.58 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.40 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.31 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 6.97 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 6.45 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 5.44 (sept,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 4.83 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.51-4.30 (m, 3H), 4.22 (t,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 1.68 (m, 1H),

1.51-1.38 (m, 8H), 0.94 (d,  $J = 6.4$  Hz, 6H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.4, 193.0, 192.4, 173.3, 155.6, 146.1, 143.7, 141.3, 127.7, 127.7, 127.0, 124.9, 120.0, 119.9, 119.9, 115.4, 79.6, 66.6, 51.7, 47.2, 43.6, 24.7, 22.8, 22.7, 22.1;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ calcd for  $[\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{NO}_5+\text{Na}]^+$  496.2094, found 496.2095.

### Phenylalanine derivative (5-5c)



67% yield, a yellow amorphous solid:

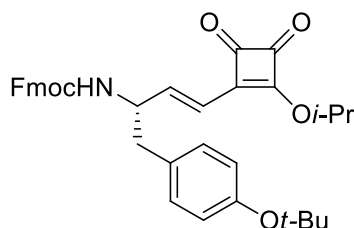
FTIR (neat) 3321, 3026, 2983, 1785, 1744, 1704, 1628, 1575, 1521, 1401, 1340, 1244, 1093, 1030, 757  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.77 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.53 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.40 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.36-6.99 (m, 8H), 6.39 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 5.42 (sept,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.96 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H), 4.71 (m, 1H), 4.46 (dd,  $J = 10.4$  Hz, 6.8 Hz, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.16 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 3.01-2.87 (m, 2H), 1.45 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 1.43 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.4, 192.9, 192.4, 172.8, 155.5, 144.7, 143.7, 143.6, 141.2, 136.0, 129.3, 128.6, 127.7, 127.0, 124.9, 119.9, 115.9, 79.6, 66.7, 54.0, 47.1, 40.6, 22.7;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ calcd for  $[\text{C}_{32}\text{H}_{29}\text{NO}_5+\text{Na}]^+$  530.1938, found 530.1938.

### Tyrosine derivative (5-5d)



61% yield, a yellow amorphous solid:

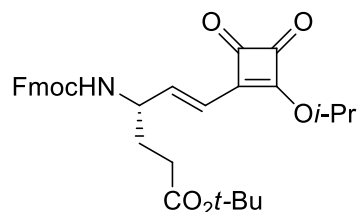
FTIR (neat) 3339, 2979, 1785, 1747, 1716, 1629, 1575, 1507, 1401, 1237, 1161, 1097, 1024, 899, 759  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.75 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.53 (br d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.40 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.30 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 7.12-6.92 (m, 3H), 6.91 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 6.35 (d,  $J = 15.6$  Hz, 1H), 5.41 (sept,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 4.99 (br s, 1H), 4.65 (m, 1H), 4.48-4.32 (m, 2H), 4.18 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 2.89 (br d,  $J = 5.6$  Hz, 2H), 1.45 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 1.43 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H), 1.32 (s, 9H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  193.4, 192.9, 192.4, 172.9, 155.5, 154.3, 144.8, 143.7, 143.7, 141.2, 130.7, 129.7, 127.7, 127.6, 127.0, 124.9, 124.2, 119.9, 115.9, 79.6, 18.4, 66.7, 54.2, 47.1, 40.0, 28.7, 22.7;

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>36</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>6</sub>+Na]<sup>+</sup> 602.2513, found 602.2512.

### Glutamic acid derivative (5-5e)



69% yield, a yellow amorphous solid:

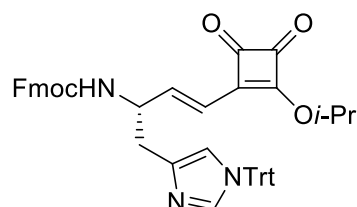
FTIR (neat) 3351, 2979, 1785, 1722, 1629, 1567, 1521, 1401, 1328, 1244, 1151, 1094, 757 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.59 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.39 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.30 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 6.97 (dd,  $J$  = 16.0 Hz, 6.4 Hz, 1H), 6.47 (d,  $J$  = 16.0 Hz, 1H), 5.42 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 5.32 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 4.41 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 4.37 (m, 1H), 4.20 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 1H), 2.40-2.26 (m, 2H), 2.00-1.81 (m, 2H), 1.49-1.39 (m, 15H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.5, 192.9, 192.4, 172.9, 172.3, 155.7, 144.7, 143.7, 141.2, 127.7, 127.0, 124.9, 119.9, 116.0, 81.0, 79.7, 66.8, 53.1, 47.1, 31.8, 29.0, 28.0, 22.7;

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>32</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>7</sub>+Na]<sup>+</sup> 568.2306, found 568.2306.

### Histidine derivative (5-5f)



45% yield, a yellow amorphous solid:

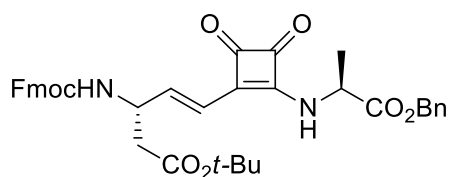
FTIR (neat) 3019, 1784, 1747, 1719, 1629, 1574, 1400, 1327, 1238, 1134, 1095, 1024, 752 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.75 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 7.65 (m, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.48-7.25 (m, 13H), 7.19-7.00 (m, 7H), 6.90 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H), 6.65 (s, 1H), 6.47 (d,  $J$  = 15.6 Hz, 1H), 5.44 (sept,  $J$  = 6.0 Hz, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.45-4.35 (m, 2H), 4.22 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 1H), 3.06 (dd,  $J$  = 14.8 Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.91 (dd,  $J$  = 14.8 Hz, 6.0 Hz, 1H), 1.46 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H), 1.44 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.1, 192.8, 192.6, 173.4, 156.0, 145.5, 144.0, 143.8, 141.8, 141.2, 138.1, 135.8, 129.6, 128.2, 128.1, 127.6, 127.0, 125.2, 119.9, 115.9, 79.5, 75.7, 67.0, 53.2, 47.1, 31.6, 22.8;

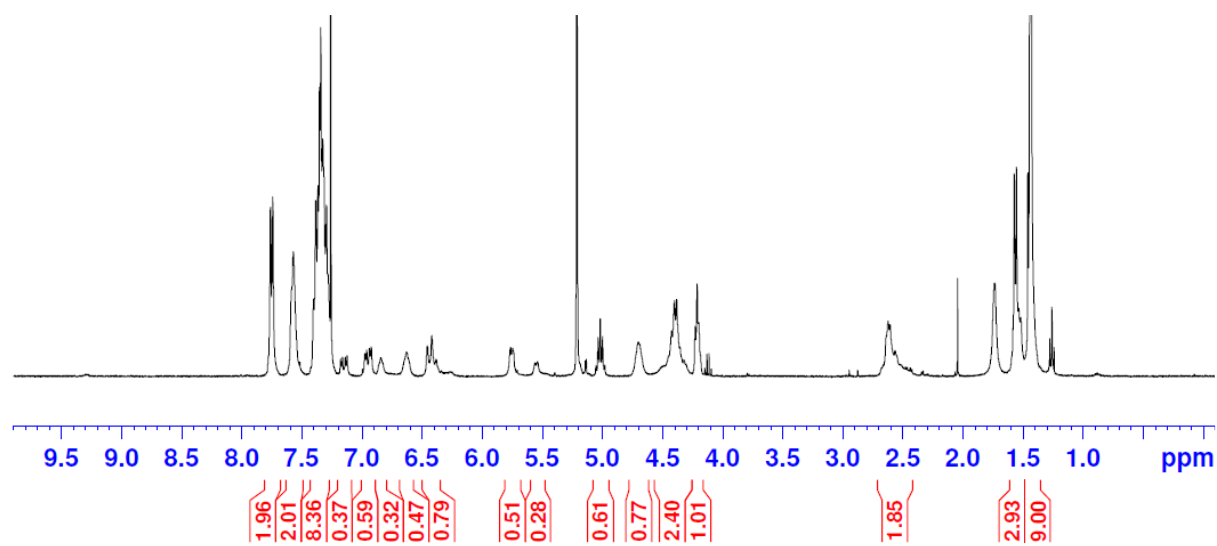
HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>48</sub>H<sub>41</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>+Na]<sup>+</sup> 762.2944, found 762.2932.

**(S,E)-tert-butyl 3-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-5-(2-(((S)-1-(benzyloxy)-1-oxopropan-2-yl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)pent-4-enoate (5-11)**

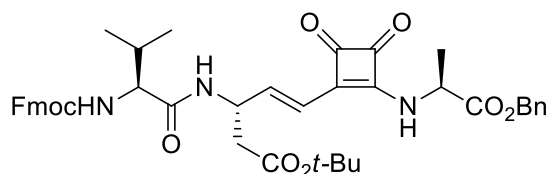


To a solution of **5-5a** (20 mg, 0.038 mmol) in MeOH (1 mL) was added a solution of H-L-Ala-OBn **5-10** (6.7 mg, 0.038 mmol) in MeOH (0.5 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 10 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/1) to give **5-11** (16 mg, 65%) as a pale yellow amorphous solid:  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  191.6, 189.4, 178.8, 171.7, 170.6, 170.0, 163.3, 155.7, 143.7, 141.3, 140.5, 134.7, 128.7, 128.3, 127.7, 127.1, 125.0, 120.0, 82.0, 68.2, 67.9, 67.0, 52.4, 50.2, 47.1, 39.7, 28.0, 20.2, 18.8;

$^1\text{H}$  NMR spectra of **5-11** in  $\text{CDCl}_3$  show a mixture of two rotamers.



**(S,E)-tert-butyl 3-((S)-2-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-3-methylbutanamido)-5-(2-(((S)-1-(benzyloxy)-1-oxopropan-2-yl)amino)-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)pent-4-enoate (5-14)**



A solution of **5-11** (29 mg, 0.045 mmol) in 20%  $\text{Et}_2\text{NH}/\text{THF}$  (1 mL) was stirred for 30 min at room temperature. The mixture was diluted with EtOAc (5 mL) and concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in THF (1 mL). To the THF solution were added Fmoc-L-Val-OH (15 mg, 0.045



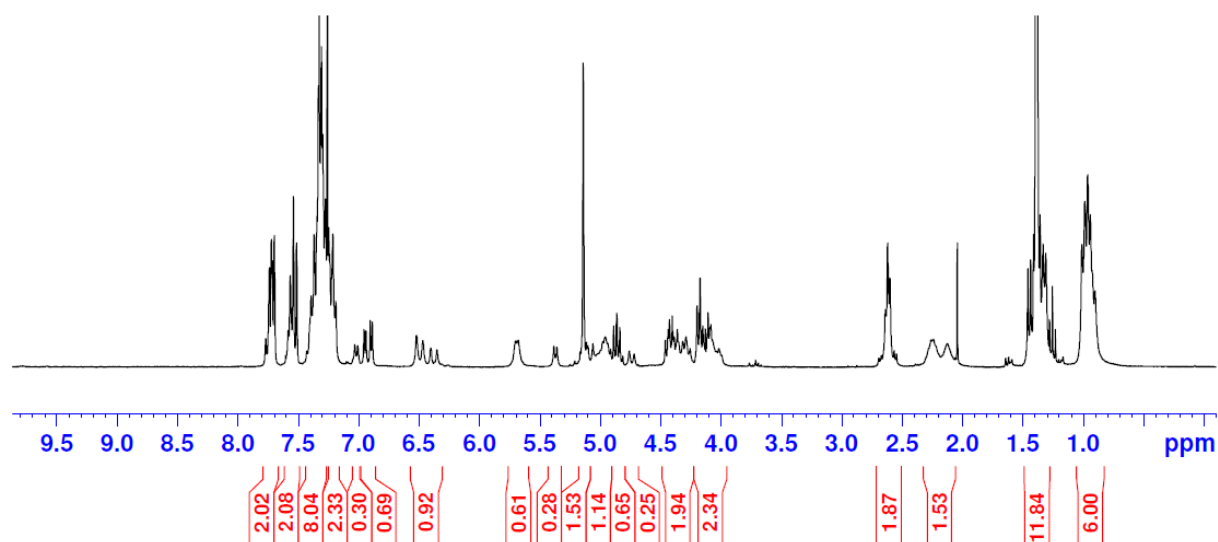
mmol), DEPBT (15 mg, 0.050 mmol) and DIEA (8.0  $\mu$ L, 0.045 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 2 h and quenched with sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and extracted with EtOAc (20 mL x 3). The combined organic layers were washed with 1N HCl, sat.  $\text{NaHCO}_3$  and brine, dried over  $\text{MgSO}_4$ , and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 5/1-1/3) to give **5-14** (12 mg, 36%) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3287, 2972, 1776, 1728, 1654, 1631, 1595, 1539, 1451, 1216, 1152, 758  $\text{cm}^{-1}$ ;

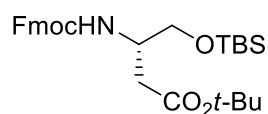
$^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  191.7, 189.4, 179.4, 177.3, 171.5, 171.1, 170.6, 170.2, 163.0, 156.9, 143.6, 143.3, 141.2, 141.1, 139.1, 134.8, 128.6, 128.2, 127.8, 127.7, 127.6, 127.3, 127.0, 125.0, 124.9, 120.0, 119.9, 117.3, 81.9, 67.6, 67.4, 61.1, 52.3, 48.2, 46.9, 39.0, 30.3, 27.9, 19.5, 19.4, 17.6, 17.3;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{43}\text{H}_{47}\text{N}_3\text{O}_9+\text{Na}]^+$  772.3210, found 772.3196.

$^1\text{H}$  NMR spectra of **5-14** in  $\text{CDCl}_3$  show a mixture of two rotamers.



#### Fmoc-L-aspartol(*Or*-Bu)-TBS (**5-20**)



To a solution of Fmoc-L-aspartol(*Or*-Bu) **5-9a** (1.70 g, 4.28 mmol) in DMF (9 mL) were added TBSCl (776 mg, 5.14 mmol) and imidazole (728 mg, 10.7 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 2 h, quenched with sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (10 mL), and extracted with  $\text{Et}_2\text{O}$  (10 mL x 3). The combined organic layers were washed with sat.  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) and brine (30 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 20/1-5/1) to give **5-20** (2.12 g, 97%) as a colorless oil:

FTIR (neat) 3345, 2951, 2925, 2861, 1718, 1507, 1451, 1367, 1308, 1252, 1160, 1114, 1081, 1057,

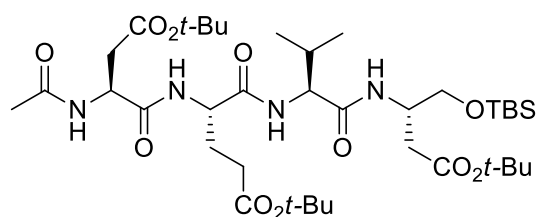
836, 777, 758, 739  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.76 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.59 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.40 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 7.31 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 5.36 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 4.37 (d,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 4.23 (d,  $J = 7.2$  Hz, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.73-3.60 (m, 2H), 2.60-2.48 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.91 (s, 9H), 0.67 (s, 6H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  170.8, 155.7, 144.0, 143.9, 141.3, 127.6, 127.0, 125.1, 119.9, 80.9, 66.7, 63.9, 49.5, 47.2, 36.7, 28.0, 25.8, 18.2, -5.5, -5.5;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{NO}_5\text{Si}+\text{Na}]^+$  534.2646, found 534.2647.

#### Ac-L-Asp(Ot-Bu)-L-Glu(Ot-Bu)-L-Val-L-aspartol(Ot-Bu)-TBS (5-22)



To a solution of **5-20** (1.78 g, 3.49 mmol) was added 25%  $\text{Et}_2\text{NH}/\text{THF}$  (10 mL) at room temperature. The mixture was stirred for 6 h and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (n-hexane/ $\text{EtOAc} = 1/1$  and 10%  $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) to give Fmoc-protected amine **5-21** (0.740 g, 73%) and used immediately for the next step.

To a mixture of amine **5-21** (0.740 g, 2.56 mmol), Ac-Asp(Ot-Bu)-Glu(Ot-Bu)-Val-OH **5-24** (1.20 g, 2.33 mmol) and  $\text{Et}_3\text{N}$  (712  $\mu\text{L}$ , 5.12 mmol) in THF (20 mL) was added DEPBT (1.53 g, 5.12 mmol) at 0  $^\circ\text{C}$ . The mixture was stirred for 2 h at room temperature. The mixture was quenched with 0.5N HCl (15 mL) and extracted with  $\text{EtOAc}$  (15 mL x 3). The combined organic layers were washed with 1N HCl (20 mL), sat.  $\text{NaHCO}_3$  (30 mL) and brine (30 mL), dried over  $\text{MgSO}_4$ , filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was triturated with  $\text{Et}_2\text{O}$ . The insoluble solid was isolated by vacuum filtration to give **5-22** (1.40 g, 77%) as a white solid.

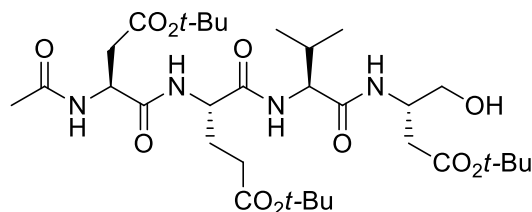
FTIR (neat) 3271, 2963, 2931, 1733, 1629, 1540, 1367, 1299, 1254, 1152, 836, 755  $\text{cm}^{-1}$ ;

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.87 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 7.25-7.14 (m, 2H), 6.84 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 4.82 (dd,  $J = 12.4$  Hz, 5.6 Hz, 1H), 4.42 (dd,  $J = 12.4$  Hz, 6.8 Hz, 1H), 4.32-4.20 (m, 2H), 3.65 (dd,  $J = 10.0$  Hz, 4.0 Hz, 1H), 3.51 (dd,  $J = 10.0$  Hz, 6.0 Hz, 1H), 2.85 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 2.65 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 6.0 Hz, 1H), 2.55 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.48 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.41-2.25 (m, 2H), 2.13 (m, 1H), 2.09-1.92 (m, 5H), 1.41 (s, 9H), 1.39 (s, 9H), 1.38 (s, 9H), 0.90 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.88 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.85 (s, 9H), 0.02 (s, 3H), 0.00 (s, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.4, 171.1, 170.9, 170.8, 170.7, 170.2, 170.1, 81.6, 81.1, 80.7, 63.5, 58.5, 53.7, 49.6, 48.1, 37.3, 36.3, 31.7, 30.4, 28.0, 27.9, 27.1, 25.8, 23.0, 19.2, 18.1, 18.0, -5.6;

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>38</sub>H<sub>70</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>Si+Na]<sup>+</sup> 809.4703, found 809.4702.

#### Ac-L-Asp(Ot-Bu)-L-Glu(Ot-Bu)-L-Val-L-aspartol(Ot-Bu) (5-23)



To a solution of **5-22** (1.24 g, 1.58 mmol) in DMF (15 mL) were added AcOH (180  $\mu$ L, 3.16 mmol) and TBAF (1 M solution in THF; 3.10 mL, 3.16 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 12 h, quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl, and extracted with EtOAc (15 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (30 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (*n*-hexane/EtOAc = 1/1 and 10% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give **5-23** (0.965 g, 91%) as a white solid.

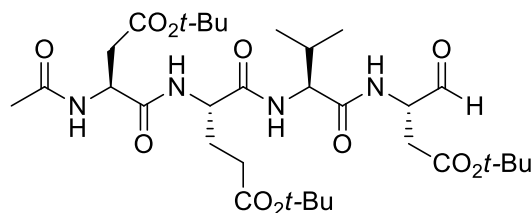
FTIR (neat) 3274, 2978, 2932, 1734, 1629, 1540, 1367, 1296, 1242, 1151, 1057, 755 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.44 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 1H), 7.08-6.95 (m, 2H), 6.89 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H), 4.62 (dd,  $J$  = 11.7 Hz, 5.4 Hz, 1H), 4.31-4.18 (m, 3H), 3.78 (dd,  $J$  = 12.0 Hz, 3.3 Hz, 1H), 3.66 (dd,  $J$  = 12.0 Hz, 4.2 Hz, 1H), 2.90 (dd,  $J$  = 16.5 Hz, 5.1 Hz, 1H), 2.79 (dd,  $J$  = 16.5 Hz, 5.4 Hz, 1H), 2.58-2.52 (m, 2H), 2.49-2.40 (m, 2H), 2.32 (m, 1H), 2.14-2.02 (m, 5H), 1.47 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 0.96 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H), 0.93 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  174.0, 171.9, 171.1, 170.9, 170.9, 170.8, 170.6, 82.0, 81.5, 80.8, 63.9, 59.2, 54.8, 50.3, 49.0, 37.1, 36.6, 31.9, 30.0, 28.0, 28.0, 27.9, 26.4, 23.0, 19.3, 18.1;

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>32</sub>H<sub>56</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>+Na]<sup>+</sup> 695.3838, found 695.3837.

#### Ac-L-Asp(Ot-Bu)-L-Glu(Ot-Bu)-L-Val-L-aspartal(Ot-Bu) (5-19)



To a solution of **5-23** (545 mg, 0.810 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (16 mL) was added Dess-Martin periodinane (686 mg, 1.62 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 2 h. The mixture was quenched with 2 M Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (10 mL) and sat. NaHCO<sub>3</sub> (10 mL), extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL x 3). The combined organic phase were washed with brine (20 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo*. The product **5-19** (533 mg, 98%) was obtained as a collarless oil which was used directly for the next step.

FTIR (neat) 3279, 2972, 1722, 1631, 1536, 1368, 1215, 1152, 748 cm<sup>-1</sup>;

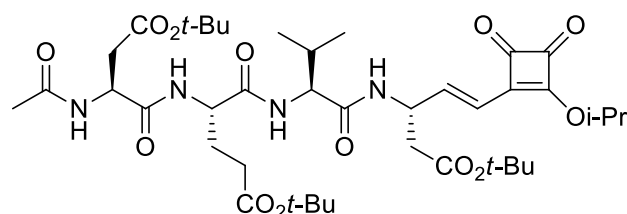
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.60 (s, 1H), 8.02 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H), 7.33 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 6.89 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.69 (dt, *J* = 7.2 Hz, 5.2 Hz, 1H), 4.54 (dt, *J* = 7.6 Hz, 5.6 Hz, 1H), 4.35 (dd, *J* = 8.8 Hz, 6.0 Hz, 1H), 4.28 (dt, *J* = 7.6 Hz, 5.2 Hz, 1H), 2.91 (dd, *J* = 16.8 Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.81 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.72 (dd, *J* = 16.8 Hz, 5.6 Hz, 1H), 2.53-2.25 (m, 3H), 2.16-1.99 (m, 5H), 1.46 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 0.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 198.8, 172.9, 171.7, 171.2, 171.1, 170.4, 170.2, 170.1, 81.5, 81.4, 80.9, 58.2, 55.5, 53.4, 52.1, 49.7, 37.9, 34.9, 31.7, 30.7, 28.0, 27.9, 27.6, 25.0, 22.9, 20.1, 19.1, 18.2, 13.5;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>32</sub>H<sub>54</sub>N<sub>4</sub>O<sub>11</sub>+Na]<sup>+</sup> 693.3681, found 693.3683.

### Ac-L-Asp(*Ot*-Bu)-L-Glu(*Ot*-Bu)-L-Val-[(*S,E*)-*tert*-butyl

### 3-amino-5-(2-isopropoxy-3,4-dioxocyclobut-1-en-1-yl)pent-4-enoate] (5-18)



To a suspension of NaH (9 mg, 0.224 mmol) in THF (0.5 mL) under argon at 0 °C were added the squaric phosphonate **5-4** (59 mg, 0.224 mmol) in THF (1 mL) and 15-Crown-5 (44 μL, 0.224 mmol). The resulting solution was stirred at room temperature for 30 min. A solution of the peptide aldehyde **5-19** (100 mg, 0.149 mmol) in THF (2 mL) was added and stirred at room temperature for 2 h. The mixture was quenched with sat. NH<sub>4</sub>Cl, and the THF solvent was removed under reduced pressure. The residual aqueous solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (0-3% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give **5-18** (90 mg, 75%) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3272, 2979, 1788, 1729, 1629, 1577, 1539, 1393, 1367, 1300, 1256, 1150, 1095, 754 cm<sup>-1</sup>;

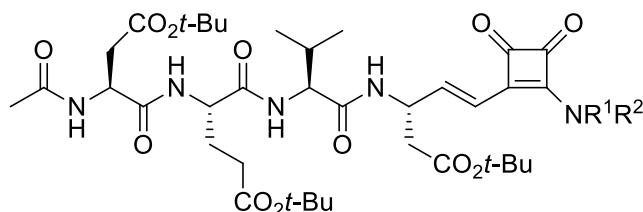
<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.20 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 7.28 (m, 1H), 7.18-7.01 (m, 3H), 6.52 (d, *J* = 15.9 Hz, 1H), 5.38 (sept, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.97 (m, 1H), 4.68 (m, 1H), 4.31 (dd, *J* = 8.7 Hz, 5.7 Hz, 1H), 4.21 (m, 1H), 2.90 (dd, *J* = 16.8 Hz, 4.5 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 16.8 Hz, 5.4 Hz, 1H), 2.71-2.55 (m, 2H), 2.49-2.24 (m, 3H), 2.19-1.98 (m, 5H), 1.48-1.30 (m, 33H), 1.00-0.85 (m, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.2, 193.0, 192.7, 174.3, 173.0, 172.0, 171.1, 170.9, 170.7, 170.6, 169.6, 143.6, 111.6, 82.0, 81.7, 81.5, 79.5, 59.0, 55.3, 50.2, 48.6, 39.8, 36.9, 32.0, 29.4,

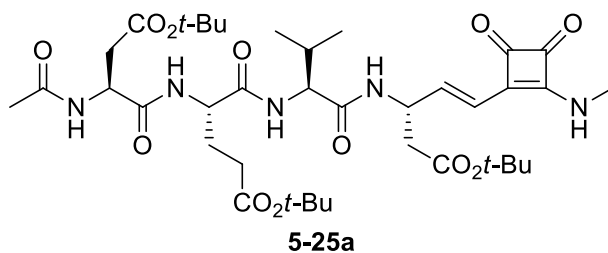
28.0, 27.9, 25.8, 23.0, 22.64, 22.61, 19.4, 17.8;

HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>40</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>13</sub>+Na]<sup>+</sup> 829.4206, found 829.4197.

### Synthesis of 5-25a-j.



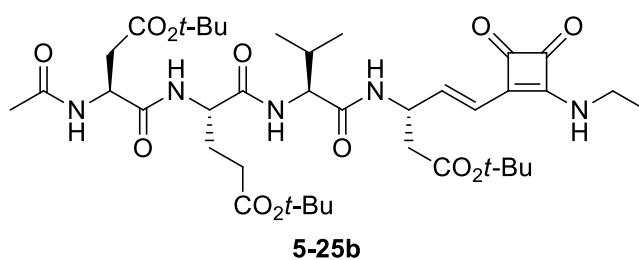
To a solution of **5-18** (15.0 mg, 0.0186 mmol) in MeOH (1 mL) was added an appropriate amine (0.0186 mmol) at room temperature. The mixture was stirred for 1 min and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (0-5% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give the corresponding squaric amide **5-25a-j** in the indicated yield:



<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.64 (br s, 1H), 7.55 (br s, 1H), 7.35-7.26 (m, 2H), 7.19 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H), 6.87 (dd,  $J$  = 15.6 Hz, 3.6 Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J$  = 15.6 Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 4.30 (dd,  $J$  = 8.4 Hz, 6.4 Hz, 1H), 4.22 (m, 1H), 3.32 (d,  $J$  = 4.8 Hz, 3H), 2.88 (dd,  $J$  = 16.8 Hz, 5.2 Hz, 1H), 2.82 (dd,  $J$  = 16.8 Hz, 5.2 Hz, 1H), 2.65 (dd,  $J$  = 14.4 Hz, 4.8 Hz, 1H), 2.55 (dd,  $J$  = 14.4 Hz, 9.6 Hz, 1H), 2.51-2.45 (m, 2H), 2.31 (m, 1H), 2.15-2.05 (m, 5H), 1.47 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.00 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H), 0.97 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 3H);

<sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 193.0, 189.4, 181.0, 174.9, 172.5, 171.9, 171.5, 170.8, 170.0, 162.8, 139.0, 115.8, 82.5, 82.2, 81.3, 60.4, 56.0, 50.9, 48.7, 40.1, 36.4, 32.1, 31.4, 29.6, 28.1, 28.0, 27.9, 25.3, 22.9, 19.5, 18.5;

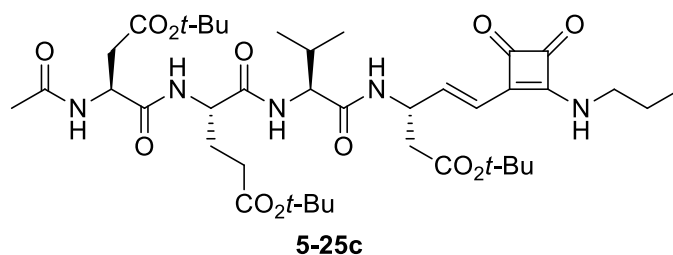
HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>38</sub>H<sub>59</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 800.4052, found 800.4057.



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.65 (d,  $J = 4.0$  Hz, 1H), 7.64 (br s, 1H), 7.37 (m, 1H), 7.33 (d,  $J = 4.4$  Hz, 2H), 7.22 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.87 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 3.6 Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.04 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 4.31 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 4.21 (m, 1H), 3.77-3.67 (m, 2H), 2.92 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 2.86 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 5.2 Hz, 1H), 2.65 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 2.54 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 10.0 Hz, 1H), 2.52-2.43 (m, 2H), 2.30 (m, 1H), 2.15-2.04 (m, 5H), 1.47 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.27 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 1.01 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.97 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.8, 189.3, 181.3, 174.7, 172.5, 172.0, 171.6, 170.9, 170.1, 170.0, 162.6, 138.9, 115.8, 82.5, 82.2, 81.3, 70.3, 60.4, 56.1, 51.0, 48.7, 40.2, 39.8, 36.4, 32.1, 29.6, 28.1, 28.0, 27.9, 25.3, 22.9, 19.5, 18.5;

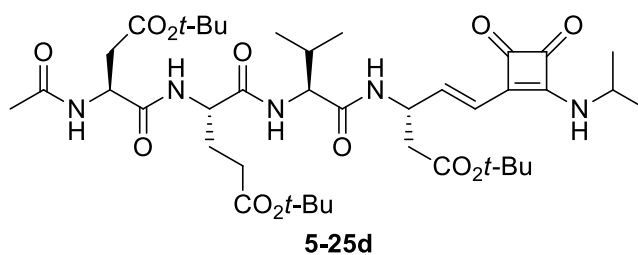
HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{39}\text{H}_{61}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  814.4209, found 814.4210.



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.64 (br s, 1H), 7.63 (br s, 1H), 7.40 (br s, 1H), 7.33 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.23 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H), 6.88 (dd,  $J = 16.0$  Hz, 3.2 Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 16.0$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.04 (m, 1H), 4.60 (q,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 4.31 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 6.8 Hz, 1H), 4.21 (q,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 3.64 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 2.92 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.85 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.65 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.53 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 10.0 Hz, 1H), 2.52-2.40 (m, 2H), 2.28 (m, 1H), 2.17-2.01 (m, 5H), 1.63 (sext,  $J = 7.2$ , 2H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.26 (t,  $J = 8.0$  Hz, 3H), 1.04-0.92 (m, 9H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.8, 189.3, 181.0, 174.9, 172.5, 172.0, 171.5, 170.9, 170.1, 170.0, 162.6, 138.9, 115.8, 82.5, 82.3, 81.3, 70.4, 60.4, 56.2, 51.0, 48.8, 40.2, 36.4, 32.1, 29.6, 28.1, 28.0, 27.9, 25.2, 24.2, 22.9, 19.5, 18.6, 10.9;

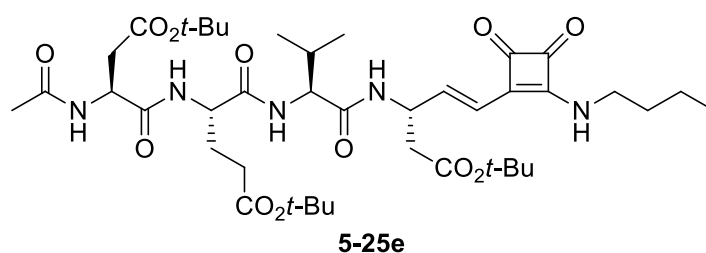
HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{40}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  828.4365, found 828.4367.



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.64 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 7.63 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.41 (d,  $J = 6.0$  Hz, 1H), 7.36 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.23 (m, 1H), 6.88 (dd,  $J = 16.0$  Hz, 3.6 Hz, 1H), 6.38 (dd,  $J = 16.0$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.04 (m, 1H), 4.61 (m, 1H), 4.39 (m, 1H), 4.31 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 6.8 Hz, 1H), 4.19 (m, 1H), 2.93 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.87 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 2.65 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.53 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 10.4 Hz, 1H), 2.52-2.43 (m, 2H), 2.28 (m, 1H), 2.17-2.03 (m, 5H), 1.47 (s, 9H), 1.43 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.29 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.27 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 1.01 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.98 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.7, 189.1, 179.6, 174.9, 172.5, 172.0, 171.5, 171.0, 170.9, 170.0, 162.6, 138.8, 115.7, 82.5, 82.3, 81.3, 70.3, 60.5, 56.3, 50.9, 48.9, 47.1, 40.3, 36.4, 32.1, 29.6, 28.0, 28.0, 27.9, 25.2, 24.0, 23.8, 22.9, 19.5, 18.7;

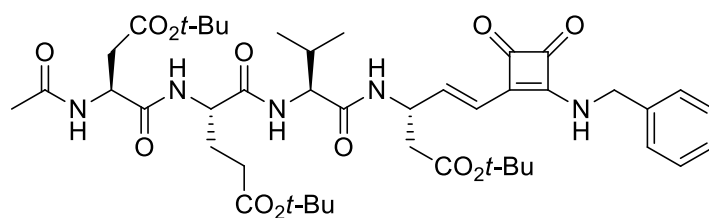
HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{40}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  828.4365, found 828.4367.



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.61 (br s, 1H), 7.71 (br s, 1H), 7.44 (br s, 1H), 7.34 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 7.24 (m, 1H), 6.88 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 3.6 Hz, 1H), 6.40 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.59 (m, 1H), 4.30 (dd,  $J = 8.0$  Hz, 7.2 Hz, 1H), 4.19 (m, 1H), 3.67 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.95-2.80 (m, 2H), 2.64 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.53 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 10.0 Hz, 1H), 2.50-2.42 (m, 2H), 2.27 (m, 1H), 2.15-2.04 (m, 5H), 1.63-1.52 (m, 2H), 1.49-1.35 (m, 29H), 1.02-0.89 (m, 9H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.8, 189.3, 180.6, 174.9, 172.5, 172.0, 171.5, 170.9, 170.0, 162.6, 138.8, 115.7, 82.5, 82.3, 81.3, 70.4, 60.4, 56.3, 50.9, 48.9, 44.6, 40.2, 36.4, 32.9, 32.1, 29.5, 28.1, 28.0, 27.9, 25.2, 22.9, 19.5, 18.7, 13.8;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{41}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  842.4522, found 842.4523.

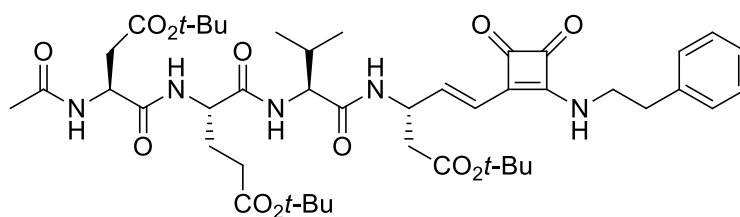


**5-25f**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.56 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 8.08 (br s, 1H), 7.38-7.24 (m, 7H), 7.17 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.87 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 3.2 Hz, 1H), 6.42 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.09-4.96 (m, 2H), 4.68 (dd,  $J = 14.8$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 4.51 (q,  $J = 4.8$  Hz, 1H), 4.22 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 7.2 Hz, 1H), 3.93 (q,  $J = 5.2$  Hz, 1H), 2.80 (br d,  $J = 3.6$  Hz, 2H), 2.65 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 2.51 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 10.0 Hz, 1H), 2.38-2.18 (m, 3H), 2.05 (s, 3H), 1.83-1.72 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.40 (s, 9H), 0.99 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.97 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.9, 189.2, 180.5, 175.2, 172.5, 172.1, 171.3, 171.0, 170.9, 170.0, 163.0, 138.9, 137.3, 128.9, 128.0, 127.9, 115.8, 82.5, 82.4, 81.3, 60.6, 56.3, 50.7, 49.0, 48.7, 40.2, 36.3, 32.0, 29.3, 28.1, 28.0, 27.9, 24.7, 22.8, 19.5, 18.9;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{44}\text{H}_{63}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  876.4365, found 876.4365.



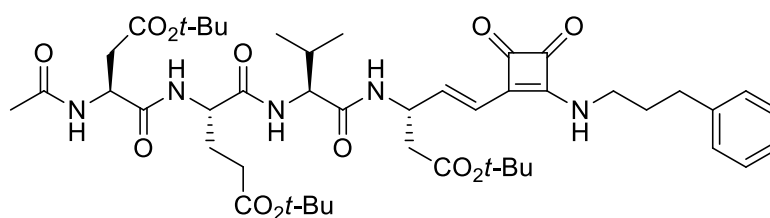
**5-25g**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.58 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 7.80 (br s, 1H), 7.37 (br s, 1H), 7.32-7.16 (m, 7H), 6.88 (dd,  $J = 16.0$  Hz, 3.6 Hz, 1H), 6.39 (dd,  $J = 16.0$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.03 (m, 1H), 4.57 (m, 1H), 4.29 (dd,  $J = 8.8$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.99-3.82 (m, 2H), 3.01-2.79 (m, 4H), 2.63 (dd,  $J = 14.8$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.53 (dd,  $J = 14.8$  Hz, 10.0 Hz, 1H), 2.46-2.38 (m, 2H), 2.28 (m, 1H), 2.09-1.98 (m, 5H), 1.46 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.00 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.96 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.7, 189.3, 180.7, 175.1, 172.4, 171.9, 171.4, 171.0, 170.9, 170.0, 162.9, 139.0, 137.6, 128.9, 128.6, 126.7, 115.8, 82.5, 82.4, 81.3, 60.4, 56.1, 50.8, 48.9, 46.1, 40.2, 37.6, 36.3, 32.0, 29.4, 28.1, 28.0, 27.9, 25.1, 22.9, 19.5, 18.6;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{45}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  890.4522, found 890.4534.



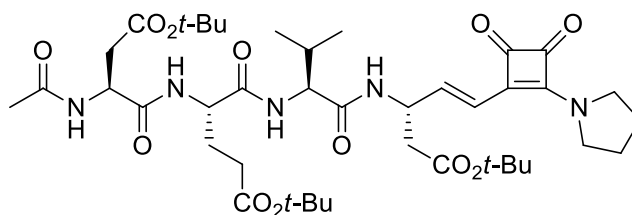


**5-25h**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.65 (d,  $J = 3.6$  Hz, 1H), 7.62 (br s, 1H), 7.40-7.13 (m, 8H), 6.86 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 3.6 Hz, 1H), 6.41 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 2.0 Hz, 1H), 5.04 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 4.31 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 4.15 (m, 1H), 3.78-3.65 (m, 2H), 2.93-2.85 (m, 2H), 2.75-2.62 (m, 3H), 2.54 (dd,  $J = 14.4$  Hz, 10.0 Hz, 1H), 2.45-2.25 (m, 3H), 2.08 (s, 3H), 2.07-2.00 (m, 2H), 1.99-1.89 (m, 2H), 1.46 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.01 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.98 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.8, 189.3, 180.7, 175.0, 172.5, 172.1, 171.4, 171.0, 170.0, 162.8, 140.9, 138.9, 128.5, 128.3, 126.1, 115.7, 82.5, 82.3, 81.3, 70.5, 60.4, 56.4, 50.8, 48.9, 44.4, 40.2, 36.4, 32.6, 32.0, 29.5, 28.1, 28.0, 27.9, 25.1, 22.9, 19.5, 18.6;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{46}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  904.4678, found 904.4682.

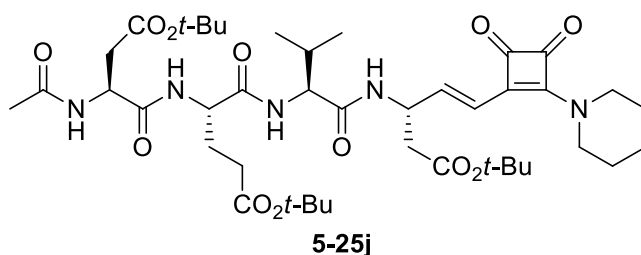


**5-25i**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.30 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 7.28-7.25 (m, 2H), 7.12 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 7.04 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.52 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.99 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.31 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 5.2 Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.79-3.65 (m, 2H), 2.93 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 4.4 Hz, 1H), 2.81 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 5.6 Hz, 1H), 2.63-2.58 (m, 2H), 2.48-2.34 (m, 3H), 2.21-1.91 (m, 9H), 1.45 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.40 (s, 9H), 0.96 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.93 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H);

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.3, 189.4, 176.1, 174.6, 172.4, 171.2, 171.1, 170.8, 170.4, 170.1, 162.3, 139.1, 117.4, 82.2, 82.0, 81.3, 59.2, 56.0, 50.2, 49.4, 49.1, 48.8, 40.3, 36.7, 32.1, 29.1, 28.0, 28.0, 25.4, 25.2, 24.9, 22.9, 19.5, 17.8;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{41}\text{H}_{64}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  840.4371, found 840.4370.

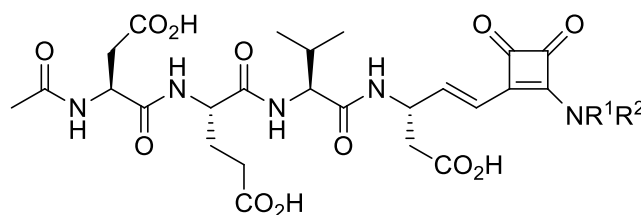


$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.34 (d,  $J = 4.4$  Hz, 1H), 7.34-7.26 (m, 2H), 7.21 (dd,  $J = 15.2$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 7.06 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H), 6.54 (dd,  $J = 15.2$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.69 (m, 1H), 4.30 (dd,  $J = 8.4$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.99 (m, 1H) 3.87 (m, 1H), 3.66 (m, 1H), 3.57 (m, 1H), 2.94 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 4.0 Hz, 1H), 2.83 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 5.6 Hz, 1H), 2.62 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 2.47-2.32 (m, 3H), 2.12-2.00 (m, 5H), 1.79-1.62 (m, 4H), 1.45 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.40 (s, 9H), 0.96 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H), 0.93 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H);

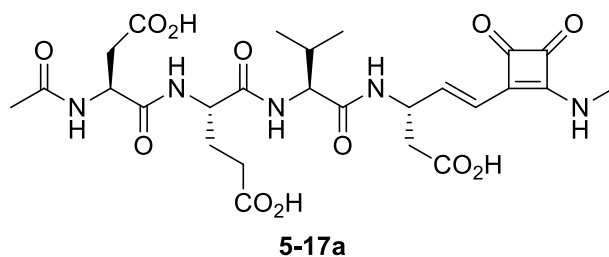
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  192.3, 189.3, 176.2, 174.7, 172.4, 171.3, 171.1, 170.8, 170.4, 170.1, 161.0, 139.6, 117.5, 82.2, 82.0, 81.3, 59.3, 56.1, 50.1, 49.4, 48.9, 48.3, 40.3, 36.7, 32.1, 29.0, 28.04, 27.98, 27.96, 25.9, 25.3, 23.5, 22.9, 19.5, 17.8;

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ calcd for  $[\text{C}_{42}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  854.4527, found 854.4516.

#### Synthesis of 5-17a-j.

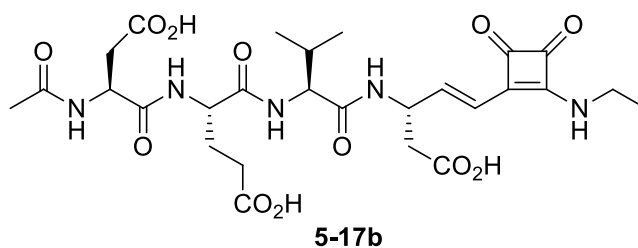
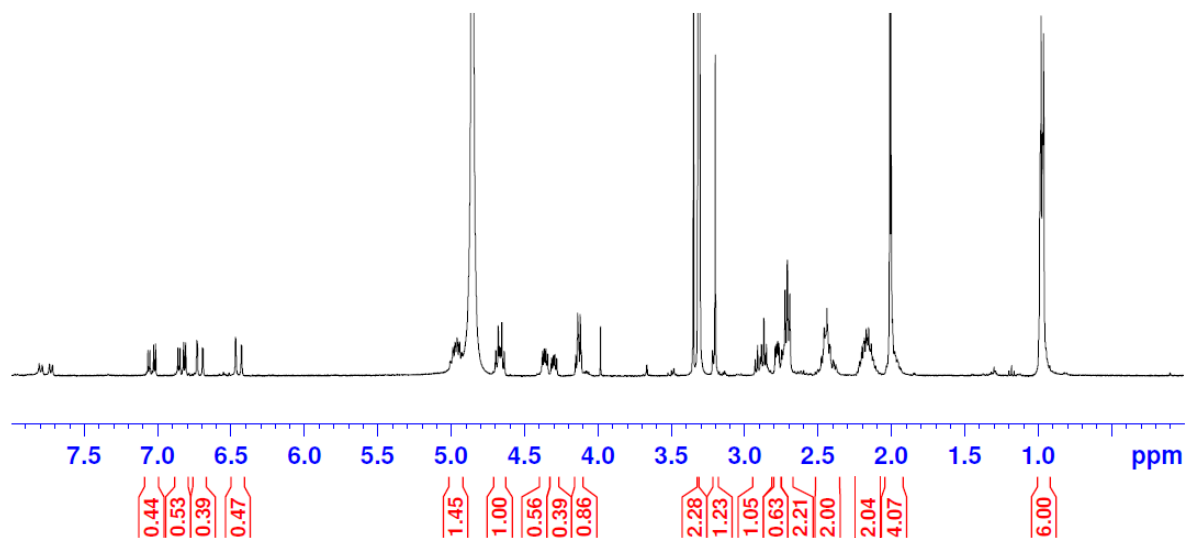


The protected peptide **5-25a-j** were treated with TFA for 10 min at room temperature. TFA was removed under reduced pressure, and the residue washed with  $\text{Et}_2\text{O}$  (1 mL x 2). The pale yellow powder were then dried under high vacuum. Products **5-17a-j** obtained in the indicated yield:



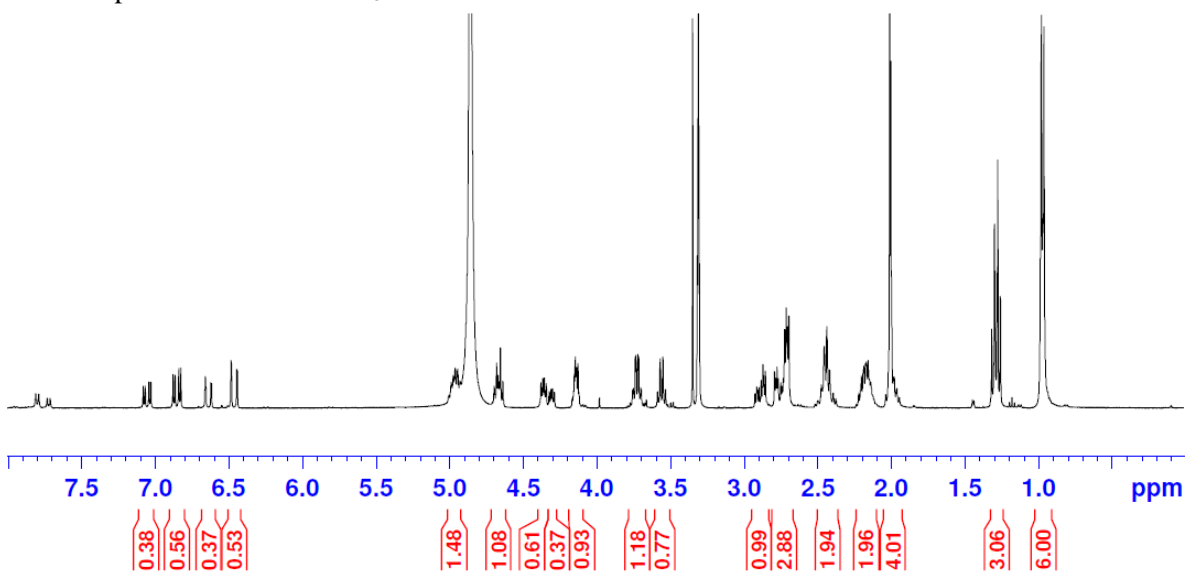
HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$ calcd for  $[\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  632.2174, found 632.2197.

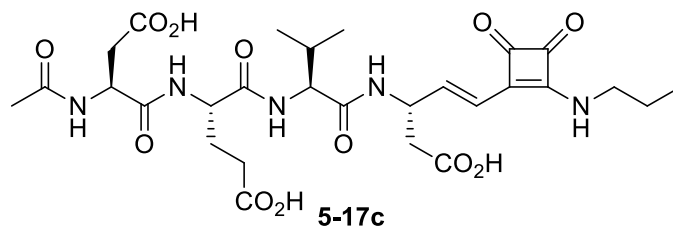
$^1\text{H}$  NMR spectra of **5-17a** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  show a mixture of two rotamers.



HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{27}\text{H}_{37}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  646.2336, found 646.2339.

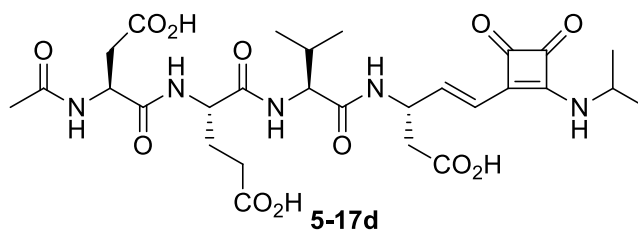
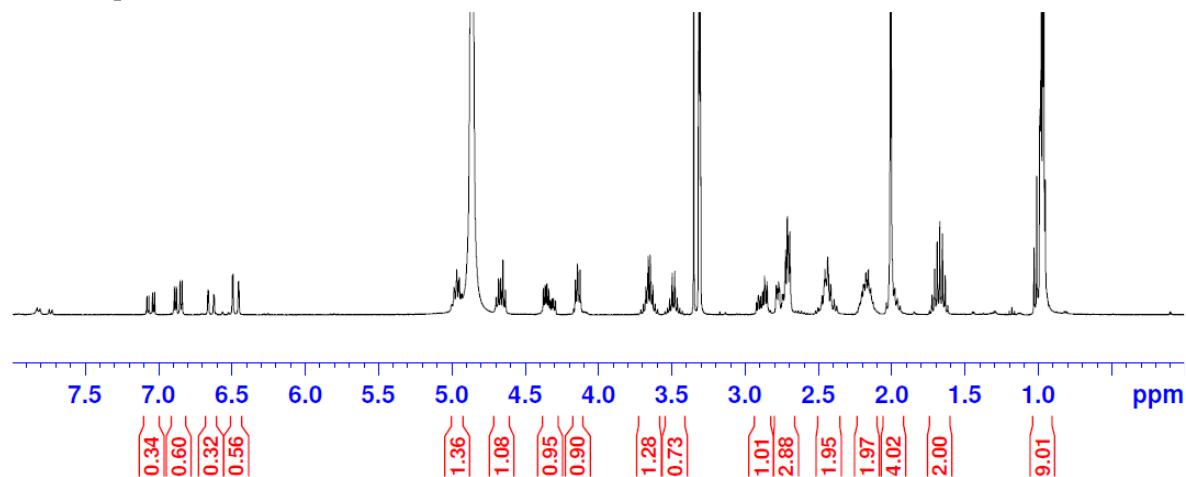
$^1\text{H}$  NMR spectra of **5-17b** in  $\text{CD}_3\text{OD}$  show a mixture of two rotamers.





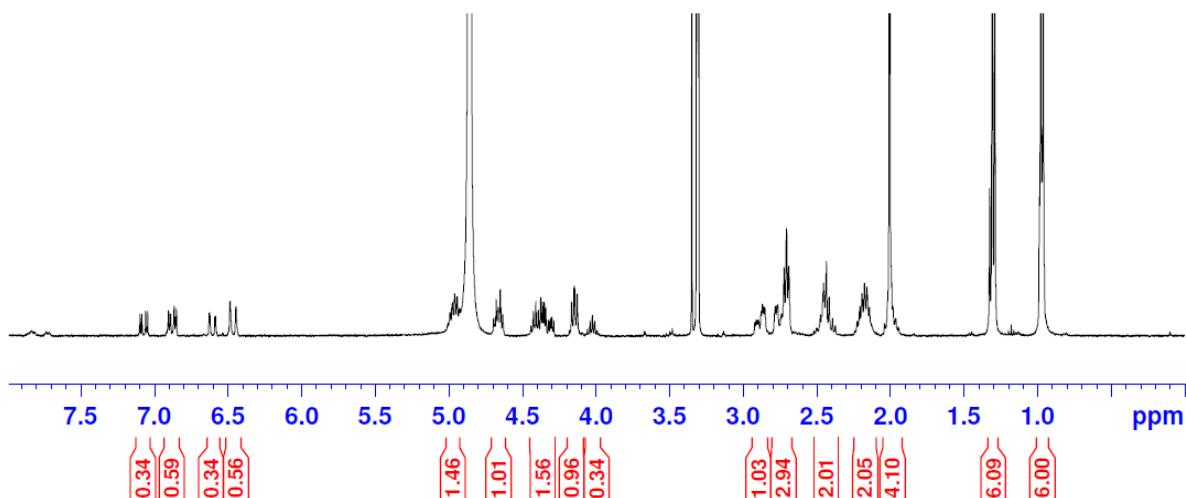
HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 660.2493, found 660.2481.

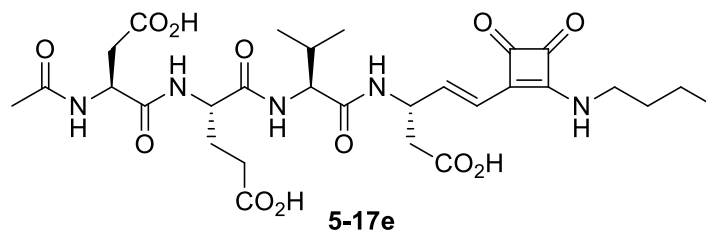
<sup>1</sup>H NMR spectra of **5-17c** in CD<sub>3</sub>OD show a mixture of two rotamers.



HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>28</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 660.2493, found 660.2478.

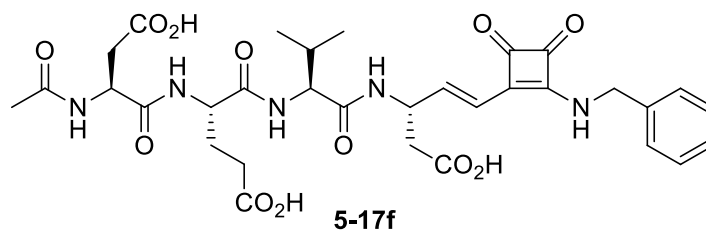
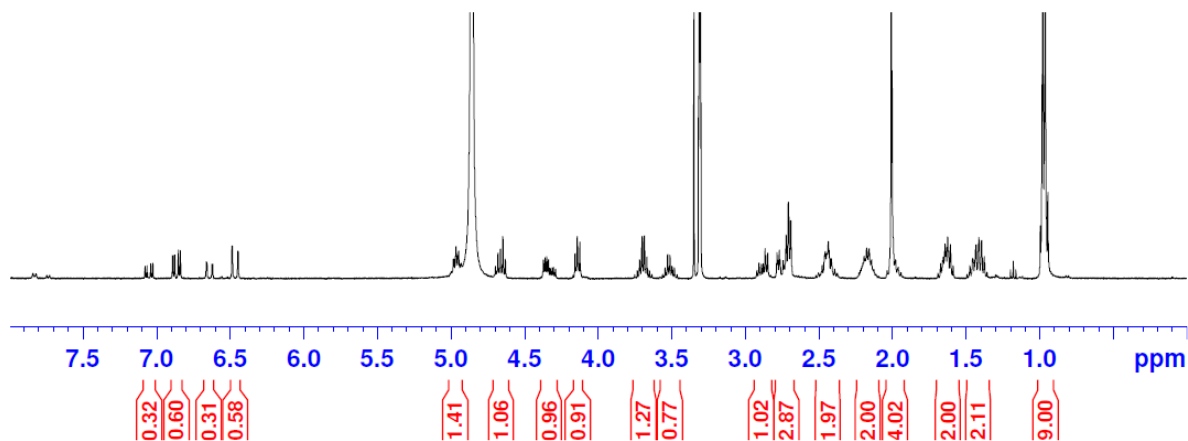
<sup>1</sup>H NMR spectra of **5-17d** in CD<sub>3</sub>OD show a mixture of two rotamers.





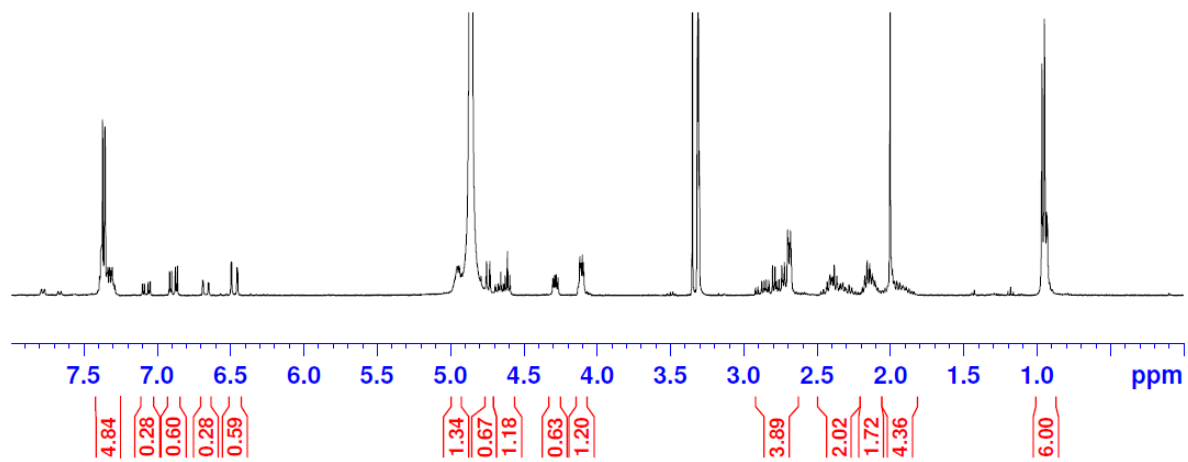
HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>29</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 674.2649, found 674.2651.

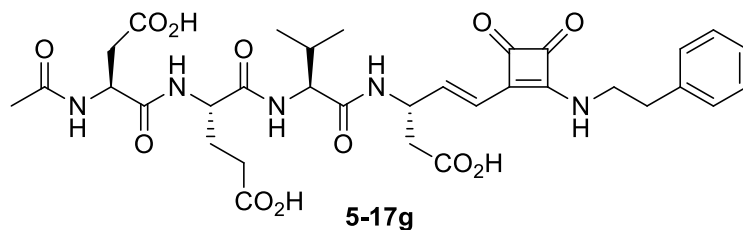
<sup>1</sup>H NMR spectra of **5-17e** in CD<sub>3</sub>OD show a mixture of two rotamers.



HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>32</sub>H<sub>39</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 708.2493, found 708.2500.

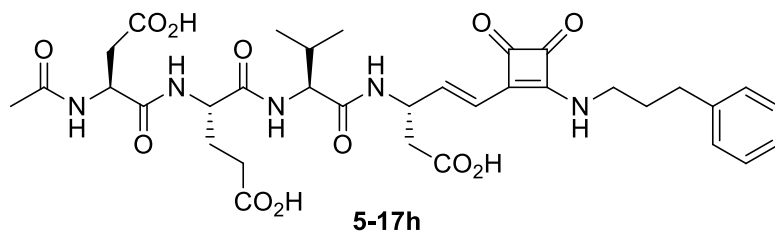
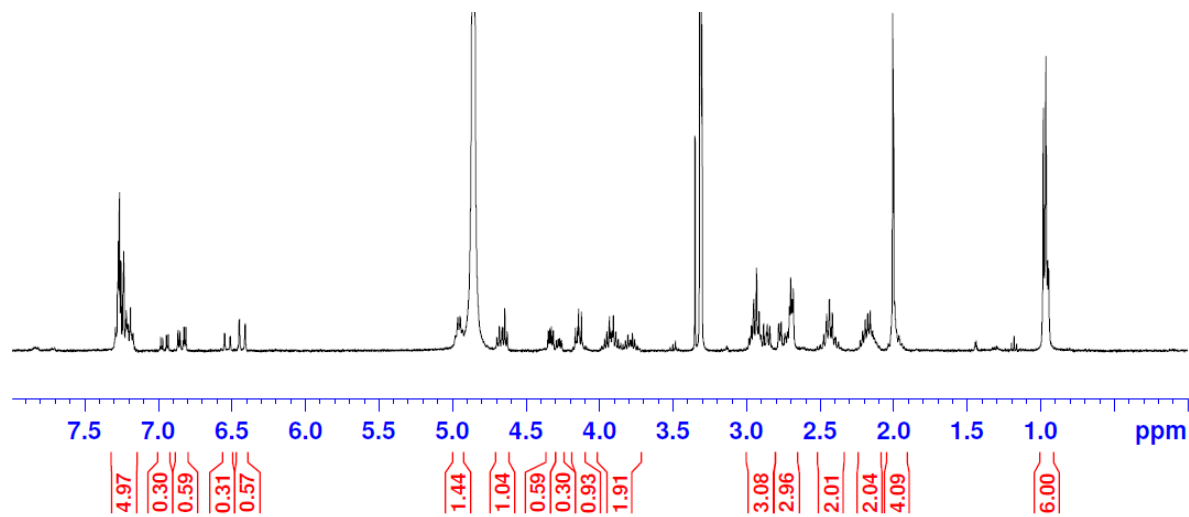
<sup>1</sup>H NMR spectra of **5-17f** in CD<sub>3</sub>OD show a mixture of two rotamers.





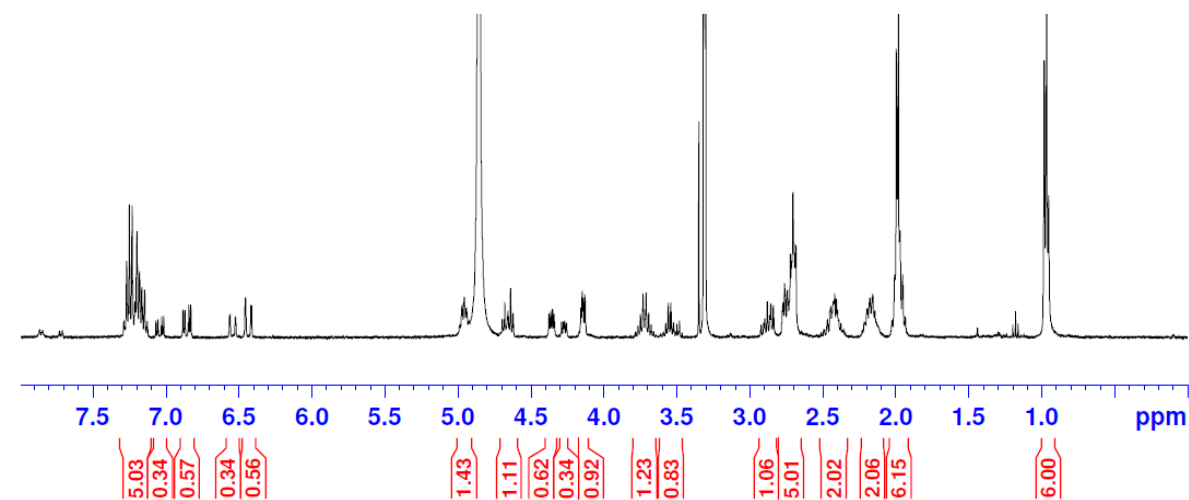
HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>33</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 722.2649, found 722.2634.

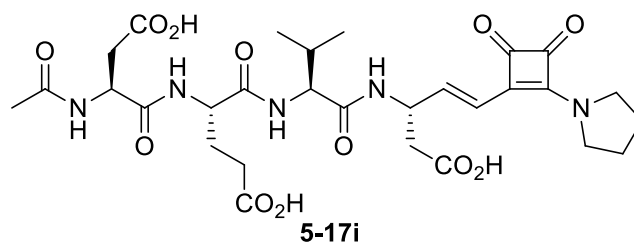
<sup>1</sup>H NMR spectra of **5-17g** in CD<sub>3</sub>OD show a mixture of two rotamers.



HRMS (ESI)  $m/z$  (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>34</sub>H<sub>43</sub>N<sub>5</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 736.2806, found 736.2779.

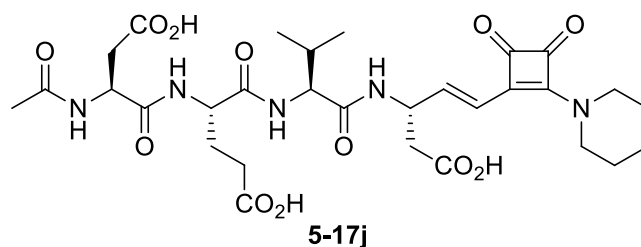
<sup>1</sup>H NMR spectra of **5-17h** in CD<sub>3</sub>OD show a mixture of two rotamers.





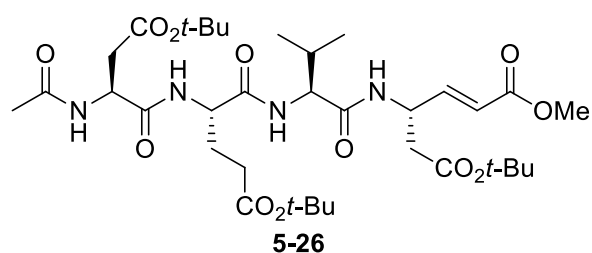
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.01 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 5.2 Hz, 1H), 6.62 (dd,  $J = 15.6$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.97 (qd,  $J = 7.2$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.67 (t,  $J = 6.8$  Hz, 1H), 4.30 (dd,  $J = 8.8$  Hz, 5.2 Hz, 1H), 4.12 (m, 1H), 3.89 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.87-3.68 (m, 2H), 2.89 (dd,  $J = 17.2$  Hz, 6.8 Hz, 1H), 2.75 (dd,  $J = 17.2$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.70 (d,  $J = 7.6$  Hz, 2H), 2.50-2.38 (m, 2H), 2.23-1.95 (m, 10H), 0.97 (d,  $J = 6.8$  Hz, 6H);

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{29}\text{H}_{39}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  672.2493, found 672.2481.



$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  7.07 (dd,  $J = 15.2$  Hz, 4.8 Hz, 1H), 6.65 (dd,  $J = 15.2$  Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.98 (q,  $J = 5.6$  Hz, 1H), 4.67 (t,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 4.27 (dd,  $J = 8.8$  Hz, 5.2 Hz, 1H), 4.11 (d,  $J = 6.4$  Hz, 1H), 4.00-3.95 (m, 2H), 3.72-3.65 (m, 2H), 2.90 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 6.8 Hz, 1H), 2.75 (dd,  $J = 16.8$  Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.74-2.68 (m, 2H), 2.50-2.38 (m, 2H), 2.23-2.10 (m, 2H), 2.05-1.92 (m, 4H), 1.85-1.67 (m, 4H), 0.98 (d,  $J = 6.0$  Hz, 6H);

HRMS (ESI)  $m/z$  ( $\text{M}+\text{Na}$ ) $^+$  calcd for  $[\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_5\text{O}_{12}+\text{Na}]^+$  686.2649, found 686.2643.



To a suspension of NaH (2.4 mg, 0.060 mmol) in THF (0.5 mL) under argon at 0 °C was added the trimethyl phosphonoacetate (8.6  $\mu\text{g}$ , 0.060 mmol) in THF (0.5 mL). The resulting solution was stirred at room temperature for 30 min. A solution of the peptide aldehyde **5-19** (40 mg, 0.060 mmol) in THF (1 mL) was added and stirred at room temperature for 1 h. The mixture was quenched with sat.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , and the THF solvent was removed under reduced pressure. The residual aqueous

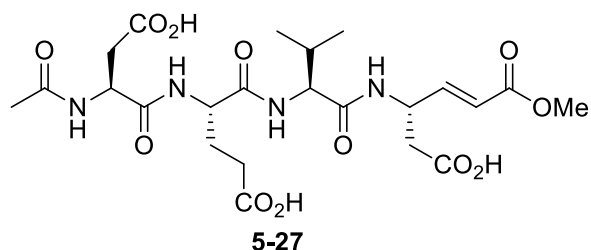
solution was extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 mL x 3). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over MgSO<sub>4</sub>, and filtered. The filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was purified by flash column chromatography on silica gel (0-2% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) to give **5-26** (28 mg, 62%) as a yellow amorphous solid:

FTIR (neat) 3262, 2980, 2935, 1729, 1629, 1539, 1393, 1367, 1253, 1152, 755 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.14 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.24 (m, 1H), 7.01-6.97 (m, 2H), 6.88 (dd, *J* = 15.6 Hz, 5.1 Hz, 1H), 5.97 (dd, *J* = 15.6 Hz, 1.8 Hz, 1H), 4.95 (m, 1H), 4.70 (m, 1H), 4.36-4.24 (m, 2H), 3.70 (s, 3H), 2.90 (dd, *J* = 16.5 Hz, 4.8 Hz, 1H), 2.71 (dd, *J* = 16.5 Hz, 5.7 Hz, 1H), 2.59-2.52 (m, 2H), 2.49-2.39 (m, 2H), 2.32 (m, 1H), 2.10-2.00 (m, 5H), 1.45 (s, 9H), 1.42 (s, 9H), 1.40 (s, 9H), 0.99-0.87 (m, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 174.4, 171.8, 171.0, 170.6, 170.4, 169.8, 166.7, 146.3, 121.3, 82.0, 81.7, 81.5, 58.9, 55.1, 51.6, 50.0, 47.3, 39.6, 36.8, 32.0, 29.5, 28.04, 27.98, 26.0, 23.0, 19.5, 17.8;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>35</sub>H<sub>58</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 749.3949, found 749.3958.



Vinyl ester **5-26** (16 mg, 0.021 mmol) was treated with TFA (1 mL) for 10 min at room temperature. TFA was removed under reduced pressure, and the residue washed with Et<sub>2</sub>O (2 x 1 mL). The pale yellow solids were then dried under high vacuum to give **5-27** (11 mg, 88%) as a white solid:

FTIR (neat) 3273, 3082, 2962, 1701, 1635, 1544, 1436, 1408, 1282, 1199, 1172, 1025, 700 cm<sup>-1</sup>;

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 6.91 (dd, *J* = 15.6 Hz, 5.2 Hz, 1H), 5.97 (dd, *J* = 15.6 Hz, 1.6 Hz, 1H), 4.91 (m, 1H), 4.68 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.36 (dd, *J* = 8.8 Hz, 4.8 Hz, 1H), 4.13 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.71 (s, 3H), 2.87 (dd, *J* = 16.8 Hz, 6.4 Hz, 1H), 2.73 (dd, *J* = 16.8 Hz, 7.2 Hz, 1H), 2.68 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.47-2.36 (m, 2H), 2.21-2.10 (m, 2H), 2.00 (s, 3H), 1.98 (m, 1H), 0.96 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H);

<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 176.8, 174.1, 173.7, 173.6, 173.5, 172.9, 168.2, 147.8, 122.2, 60.8, , 54.8, 52.1, 51.5, 39.0, 36.5, 31.4, 31.2, 27.7, 22.5, 19.8, 18.7;

HRMS (ESI) *m/z* (M+Na)<sup>+</sup>calcd for [C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>N<sub>4</sub>O<sub>12</sub>+Na]<sup>+</sup> 581.2071, found 581.2069.



## **References for Chapter 5**

- 1) Maryanoff, B. E.; Qiu, X.; Padmanabhan, K. P.; Tulinsky, A.; Almond Jr., H. R.; Andrade-Gorden, P.; Greco, M. N.; Kauffman, J. A.; Nicolaou, K. C.; Liu, A.; Brungs, P. H.; Fusetani, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8048-8052.
- 2) (a) Waspi, U.; Blanc, D.; Winkler, T.; Ruedi, P.; Dudler, R.; *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1998**, *11*, 727-733. (b) Waspi, U.; Hassa, P.; Staempfli, A. A.; Molleyres, L. P.; Winkler, T.; Dudler, R.; *Microbiol. Res.* **1999**, *154*, 89-93.
- 3) Nakao, Y.; Fujita, M.; Warabi, K.; Matsunaga, S.; Fusetani, N. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 10462-10463.
- 4) Planty, B.; Pujol, C.; Lamothe, M.; Maraval, C.; Horn, C.; Grand, C. B.; Perez, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 1735-1739.
- 5) Diness, F.; Beyer, J.; Meldal, M. *QSAR Comb. Sci.* **2004**, *23*, 130-144.
- 6) (a) Miller, B.; Friedman, A. J.; Choi, H.; Hogan, J.; McCammon, J. A.; Hook, V.; Gerwick, W. H. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 92-99. (b) Conroy, T.; Guo, J. T.; Elias, N.; Cergol, K. M.; Gut, J.; Legac, J.; Khatoon, L.; Liu, Y.; McGowan, S.; Rosenthal, P. J.; Hunt, N. H.; Payne, R. J. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10557-10563.
- 7) Newton, A. S.; Glória, P. M. C.; Gonçalves, L. M.; dos Santos, D. J. V. A.; Moreira, R.; Guedes, R. C.; Santos, M. M. M. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 3858-3863.
- 8) Hanzlik, R. P.; Thompson, S. A. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 711-712. Thompson, S. A.; Andrews, P. R.; Hanzlik, R. P. *J. Med. Chem.* **1986**, *29*, 104-111.
- 9) Yoshimori, A.; Takasawa, R.; Tanuma, S. *BMC Pharmacology* **2004**, *4*, 7.

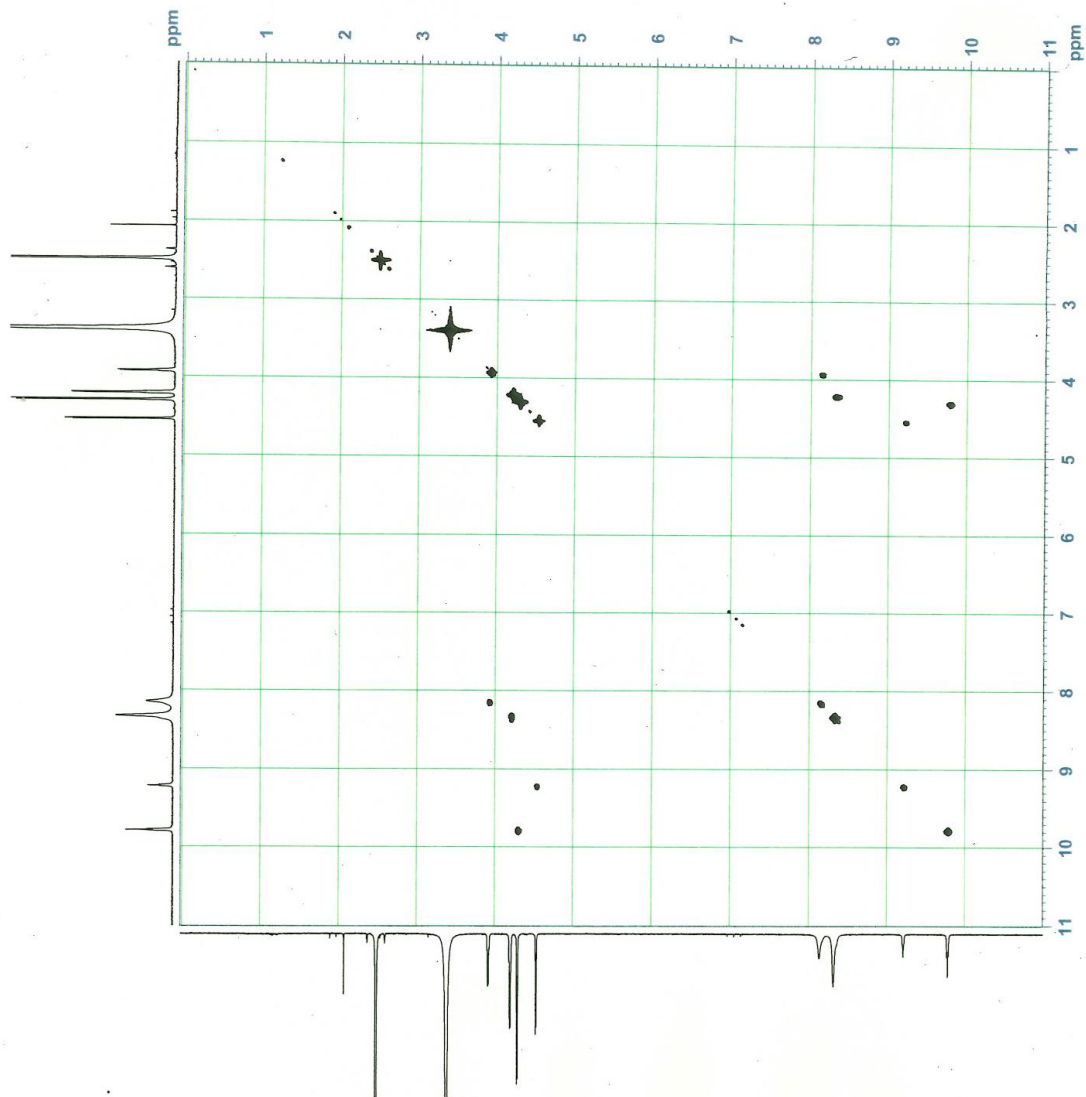
COSY spectra of 2-56a in DMSO-d<sub>6</sub>.



```

Current Data Parameters
NAME          md4
EXPNO         723
PROCNO       1
F2 - Acquisition Parameters
Date_         20130416
Time_        0
INSTRUM      spect
PROBHD       5 mm BBI_1H-BB
PULPROG      zgpg30
TD           65536
SOLVENT      CDCl3
DS           2
SWH          6613.757 Hz
FIDRES      3.222973 Hz
AQ          0.117241 sec
RG          724.1
DM          75.600 usec
DE          6.00 usec
TE          298.0 K
D0          0.00000300 sec
d1          1.50000000 sec
d13         0.00000000 sec
d16         0.00010000 sec
IN0         0.00015120 sec
***** CHANNEL f1 *****
NUC1         1H
P1           9.70 usec
PL1          0.00 dB
PL2          3.50 dB
SFO1         600.133007 MHz
***** GRADIENT CHANNEL *****
GPM1         SINE-100
GPM2         SINE-100
GPR1         10.00 $
GPR2         10.00 $
P16          1000.00 usec
F1 - Acquisition parameters
TD           65536
SFO1         600.1333 MHz
FIDRES      12.917494 Hz
AQ          0.117241 sec
SOLVENT      DMSO-d6
P16          undefined
F1 - Processing parameters
SF           600.1300020 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.00 Hz
GB           0
PC           1.00
F1 - Processing parameters
SI           1024
MC           1024
SF           600.1300038 MHz
WDW          EM
SSB          0
LB           0.00 Hz
GB           0
    
```

sqgly2\_cosy\_DMSO\_temp25



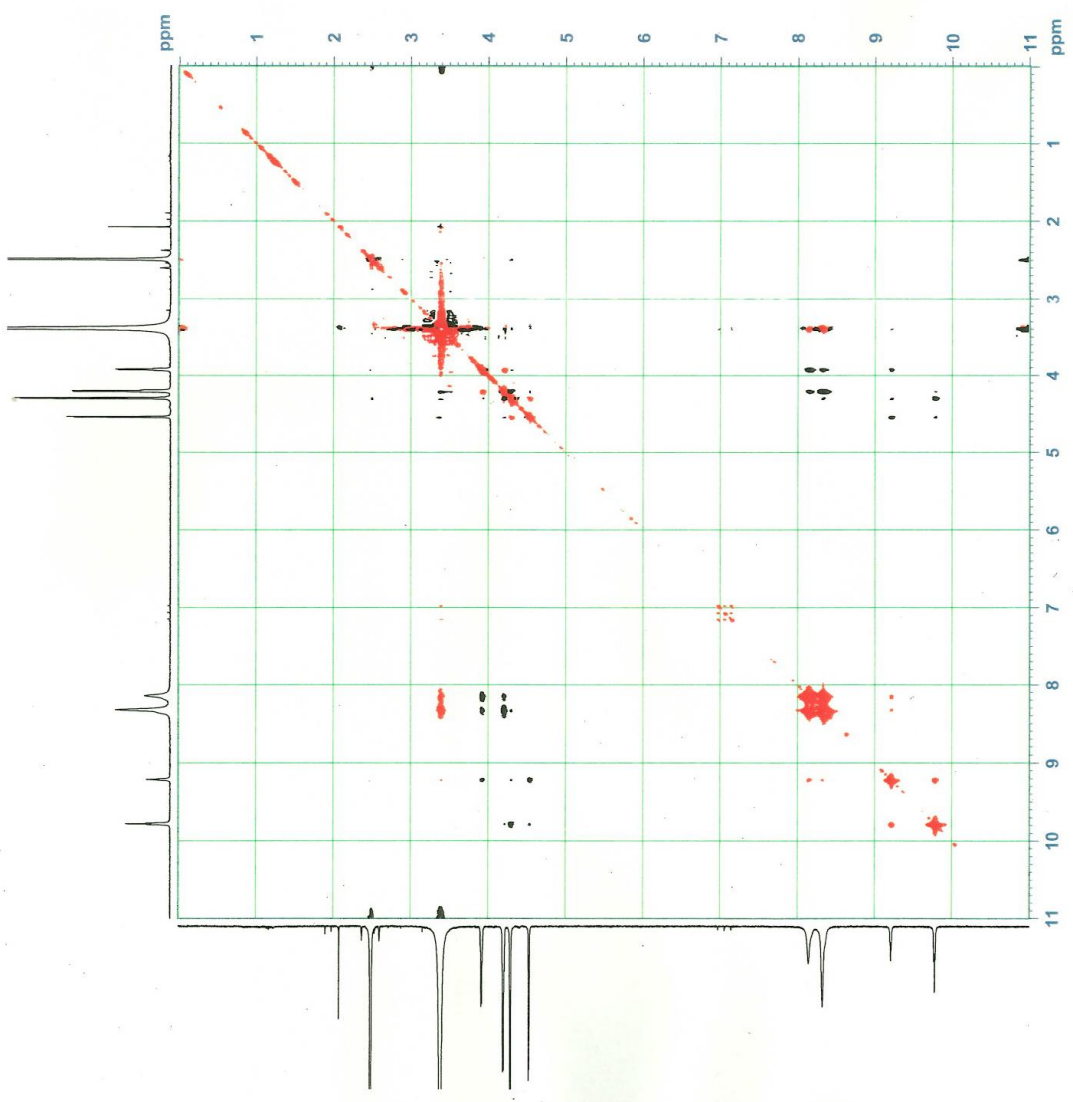
NOESY spectra of **2-56a** in DMSO-*d*<sub>6</sub>.



```

Current Data Parameters
EXPNO 724
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130416
Time 8:22
PROBHD 5 mm BBI 1H-5B
PULPROG noesy2p
PROBHD2 M05
SOLVENT DMSO
NS 20
DS 6513.48 Hz
AQ 0.1549544 sec
RG 724.00 usec
DE 7.600 usec
TE 298.0 K
D1 1.5000000 sec
D8 0.8000001 sec
IN0 0.00007560 sec
***** CHANNEL f1 *****
NUC1 1H
P1 9.18 usec
PL1 3.50 dB
SFO1 600.1313007 MHz
F1 - Acquisition parameters
ND0 2
TD 65536
FIDRES 12.917344 Hz
SN 11.020 ppm
FMODE undefined
F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 600.1313007 MHz
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 1.00
F1 - Processing parameters
SI 65536
SF 600.1300010 MHz
SSB 2
LB 0.00 Hz
GB 0
    
```

sqgly2\_noesy\_DMSO\_temp25

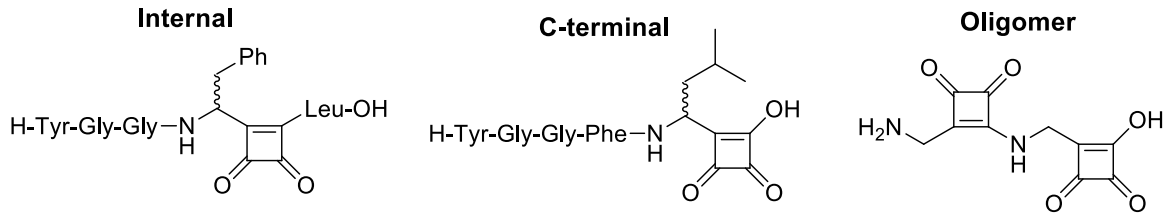


## まとめ

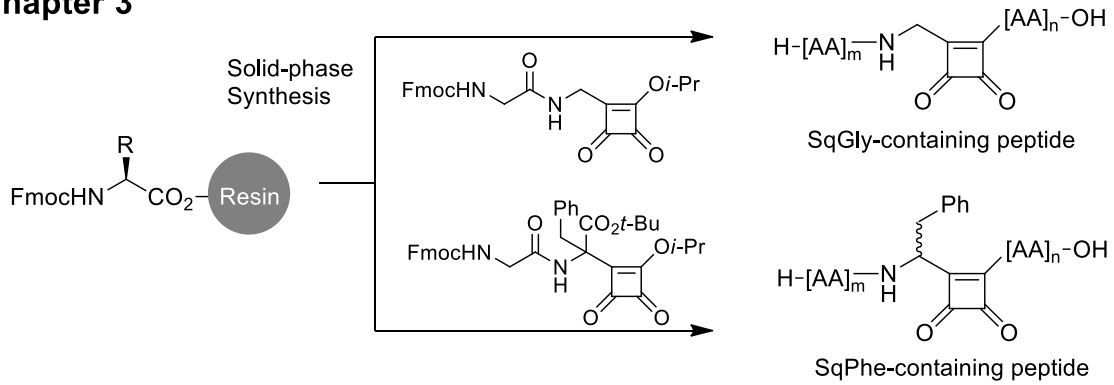
本論文では、スクアリン酸含有アミノ酸のペプチド化とその機能研究について述べた。第一章では、 $\alpha$  位に置換基をもつ  $\alpha$ -Asq をペプチドの内部および C 末端に導入したペプチドアナログの合成について述べた。SqPhe や SqLeu のペプチド化は、グリシン付加したヒドロキシシクロブテノンから N 末端側のペプチド鎖を導入後、 $\alpha$ -Asq の  $\alpha$  位のアルキル化による側鎖の導入を行うことで達成した。本手法を用いることにより、ロイシンエンケファリンの Phe および Leu 残基をそれぞれ SqPhe および SqLeu に置換した新規アナログ合成に成功した。また、 $\alpha$ -Asq の連続連結によるジペプチドアナログおよびトリペプチドアナログの合成を行った。SqGly のダイマー体の NMR 解析の結果、DMSO- $d_6$  中において Sq-アミド結合の二重結合性に起因する二つのロータマーの混合物として存在することがわかった。第三章では、 $\alpha$ -Asq の固相合成によるペプチド化について述べた。SqGly および SqPhe の固相への担持は、 $\alpha$ -Asq の N 末端に予め天然型アミノ酸を導入したジペプチドユニットを用いることで達成した。本合成法を用いることにより、異なるアミノ酸配列をもつ 162 のペプチドアナログライブラリーの構築、および、長鎖のペプチドアナログ ( $\alpha$ -Asq 含有デカペプチド) の合成に成功した。 $\alpha$ -Asq 含有デカペプチドを用いた消化酵素(カルボキシペプチダーゼ Y) に対する耐性試験を行った結果、Sq-アミド結合が消化酵素に対して抵抗性を示すことが明らかとなった。第四章では、Sq 基の電子不足な性質に着目して、 $\alpha$ -Asq を利用した Caspase-3 阻害剤の開発について述べた。 $\alpha$ -Asq をカスパーゼ-3 の認識配列 Asp-Glu-Val-Asp の C 末端に導入したテトラペプチド阻害剤を設計した。C 末端の置換基の異なる 10 種類の類縁体を合成した結果、Caspase-3 に対して最大で IC<sub>50</sub> 値 35 nM の阻害活性を見出し、Sq 基が Caspase-3 の酵素活性中心のチオールに作用することがわかった。第五章では、スクアリン酸から誘導した新規アミノ酸ユニットとして、 $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸の合成とペプチド化について述べた。 $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸の合成は光学活性なアミノアルデヒドと Sq 基を導入したホスホネートの Horner-Wadsworth-Emmons 反応により、光学活性体として合成することができた。また、 $\alpha,\beta$ -不飽和- $\gamma$ -アミノスクアリン酸のチオールアクセプターとしての性質を利用したカスパーゼ-3 阻害剤の開発を行い、最大で Caspase-3 に対して IC<sub>50</sub> 値 6.8 nM の阻害活性を見出した。この活性は既存のペプチドアルデヒド (Ac-Asp-Glu-Val-Asp-CHO) と同程度であった。

以上のように本論文では、スクアリン酸含有アミノ酸を液相および固相においてペプチド化し、生物活性ペプチドへと応用した。しかし、 $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成においては、 $\alpha$ -Asq の  $\alpha$  位の置換基の立体化学に起因する二つのジアステレオマー混合物となるという問題が残されている。今後の展開として、立体選択的に  $\alpha$ -Asq 含有ペプチドを構築する手法の開発と、さらに幅を広げた生理活性ペプチドの開発を行っていく予定である。

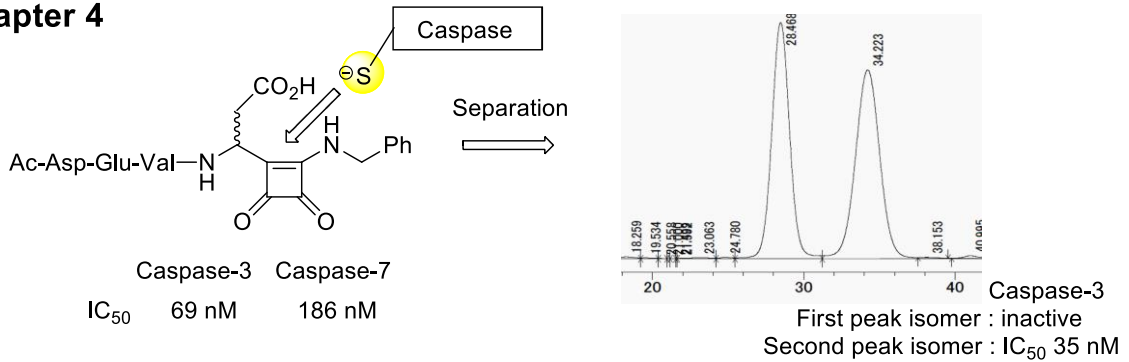
## Chapter 2



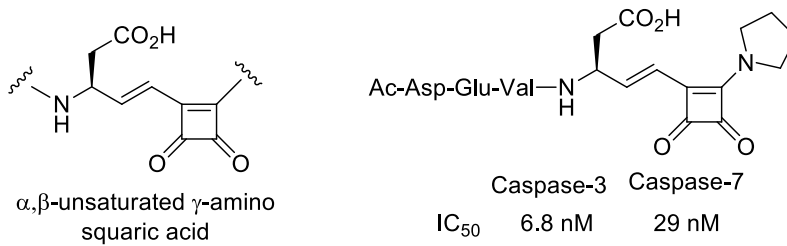
## Chapter 3



## Chapter 4



## Chapter 5



## 研究業績

### 投稿論文

Kentaro Maeda, Yu-ichi Kiniwa, Yasufumi Ohfuné, Shinichi Ishiguro, Koichi Suzuki, Kazuya Murata, Hideaki Matsuda, Tetsuro Shinada.

“Solid Phase Synthesis of  $\alpha$ -Amino Squaric Acid-containing Peptides”

*RSC Adv.*, **2014**, 4, 50639-50643.

### 講演

#### ○前田健太郎

「新規ペプチド誘導体の開発と生物活性～ペプチド創薬を指向して～」

公立3大学 産業牽引型ドクター育成プログラム インタラクティブ・マッチング（神戸、平成26年1月30日）

国際会議における発表（ポスター発表）

#### ① ○Kentaro Maeda, and Tetsuro Shinada

“Development of Caspase-3 Inhibitors using Squaric Acid-containing Peptide”

The 18th Osaka City University International Conference “Frontiers in Material Science”, P-10, Osaka, 2015 Mar.

#### ② ○Kentaro Maeda, Tetsuro Shinada, and Yasufumi Ohfuné

“Synthesis of  $\alpha$ -Amino Squaric Acid-containing Peptide on Solid Phase”

The 18th Osaka City University International Conference “Frontiers in Material Science”, P-9, Osaka, 2015 Mar.

#### ③ ○Kentaro Maeda, and Tetsuro Shinada

“Development of Caspase-3 Inhibitors Using Squaric Acid Derivatives”

The 2014 OCARINA Annual International Meeting, Poster, abst. P. 42, Osaka, 2015 Mar.

#### ④ ○Kentaro Maeda, Tetsuro Shinada

“Synthesis of Novel Peptide Analogs by Incorporation of Squaric Acid-containing Amino Acid”

The 2013 OCARINA Annual International Meeting, P-22, Osaka, 2014 Mar.

- ⑤ ○Kentaro Maeda, Yuuichi Kiniwa, Toshikazu Ishida, Yasufumi Ohfune, and Tetsuro Shinada  
“Synthesis of Novel Peptide Analogs by Incorporation of Squaric Acid-containing Amino Acid”  
4th Asia-Pacific International Peptide Symposium (APIPS 2013), P-007, Suita, 2013 Nov.
- ⑥ ○Kentaro Maeda, Yu-ichi Kiniwa, Yasufumi Ohfune, and Tetsuro Shinada  
“Synthesis of  $\alpha$ -Amino Squaric Acid-containing Peptide on Solid-phase”  
4th Modern Solid Phase Peptide Synthesis & its applications Symposium, P-46, Kobe, 2013 Nov.
- ⑦ ○Kentaro Maeda, Tetsuro Shinada, and Yasufumi Ohfune  
“Synthesis of Novel Peptide Analog by Linkage of Squaric Acid-containing Amino Acid”  
The 17th Osaka City University International Symposium, P-8, Osaka, 2013 Feb.
- ⑧ ○Kentaro Maeda, Tetsuro Shinada, and Yasufumi Ohfune  
“Synthesis of Novel Peptide Analog by Iterative Linkage of Squaric Acid-containing Amino Acid”  
The Twelfth International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry (IKCOC-12),  
PA-024, Kyoto, 2012 Nov.
- ⑨ ○Kentaro Maeda, Tetsuro Shinada, and Yasufumi Ohfune  
“Iterative Linkage of  $\alpha$ -Amino Squaric Acid”  
The 16th Osaka City University International Symposium on Dynamic Molecular Devices, P-27,  
Osaka, 2011 Nov.

国内学会における発表（口頭発表）

- ① ○Kentaro Maeda, and Tetsuro Shinada  
“Development of Caspase-3 Inhibitors Using Squaric Acid-containing Peptide”  
日本化学会第 95 春季年会、1J1-31、船橋、2015 年 3 月.
- ② ○前田健太郎、大船泰史、品田哲郎  
「 $\alpha$ -アミノスクアリン酸を導入した Caspase-3 阻害ペプチドの合成」  
日本化学会第 94 春季年会、3H6-46、名古屋、2014 年 3 月.
- ③ ○前田健太郎、品田哲郎、大船泰史

「固相合成による $\alpha$ -アミノスクアリン酸含有ペプチドの合成」  
日本化学会第 93 春季年会、3D1-28、草津、2013 年 3 月.

- ④ ○前田健太郎、松本遼太郎、品田哲郎、大船泰史  
「繰り返し連結による $\alpha$ -アミノスクアリン酸ペプチドの合成」  
日本化学会第 92 春季年会、2E3-02、横浜、2012 年 3 月.

国内学会における発表 (ポスター発表)

- ① ○Kentaro Maeda, Yasufumi Ohfuné, and Tetsuro Shinada  
“Development of squaric acid-containing peptide analogs as caspase-3 inhibitors”  
第 51 回ペプチド討論会、P-013、徳島、2014 年 10 月.
- ② ○前田健太郎、大船泰史、品田哲郎  
「 $\alpha$ -アミノスクアリン酸を導入した Caspase-3 阻害剤の開発」  
第 34 回有機合成若手セミナー、P-50、大阪、2014 年 8 月.
- ③ ○前田健太郎、茂里康、大船泰史、品田哲郎  
「スクアリン酸含有アミノ酸を組み込んだ新規ペプチドの合成と機能」  
SAT テクノロジー・ショーケース 2014、P-51、つくば、2014 年 1 月.
- ④ ○前田健太郎、品田哲郎、大船泰史  
「固相合成による $\alpha$ -アミノスクアリン酸含有ペプチドの合成」  
第 33 回有機合成若手セミナー、P-62、神戸、2013 年 8 月.
- ⑤ ○前田健太郎、木庭雄一、石田稔和、品田哲郎、大船泰史  
「スクアリン酸含有アミノ酸を組み込んだ新規ペプチドアナログの合成」  
第 54 回天然有機化合物討論会、P-41、東京、2012 年 9 月.
- ⑥ ○前田健太郎、品田哲郎、大船泰史  
「 $\alpha$ -アミノスクアリン酸連結型ペプチドアナログの合成」  
第 39 回有機反応懇談会、P-41、吹田、2012 年 8 月.
- ⑦ ○前田健太郎、品田哲郎、大船泰史  
「スクアリン酸含有アミノ酸の連続連結法の開発」  
第 38 回有機反応懇談会、P-17、堺、2011 年 8 月.



## 謝辞

本研究は大阪市立大学大学院理学研究科物質分子系専攻、分子変換学研究室において行われたものであり、終始御指導、御鞭撻を賜りました大船泰史名誉教授に深謝致します。また数々の有益な御助言および御指導を賜りました坂口和彦准教授に深謝致します。本博士論文の審査にあたり、数々の適切な御助言、御指導を賜りました、岡田恵次教授ならびに森本善樹教授に感謝致します。

第三章、固相合成による  $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成において、ペプチドライブラリーの生物活性試験を行って頂きました岩手大学研究交流部スズキラボ、鈴木幸一教授ならびに岩手大学農学部、石黒慎一博士、近畿大学薬学部創薬科学科 薬用資源学研究室、松田秀秋教授、村田和也博士に深謝致します。

NMR 依頼測定でお世話になりました土江松美博士、質量分析依頼測定でお世話になりました三宅里佳氏、下中智美氏ならびに分析技術職員の方々に感謝致します。

研究生生活を有意義なものにして下さいました先輩、同輩、後輩諸氏に感謝致します。特に第三章、固相合成による  $\alpha$ -Asq 含有ペプチドの合成の共同研究者であり、種々の有益な御助言を賜りました木庭雄一氏に深く感謝致します。長い間、研究に関する御指導、御助言を賜りました大江健太郎博士、保野陽子博士、真鍋敦博士、西村栄治博士に深く感謝致します。

学生生活を共にし、切磋琢磨しながら勉学に励んできました大阪市立大学理学部物質科学科・化学科、並びに大阪市立大学大学院理学研究科物質分子系専攻の同期の皆様に深く感謝致します。特に研究室の同期であり、数々の有益な御助言を頂きました下田愛里氏および若林由華氏に深く感謝致します。後期博士課程の同期であり、色々と相談にのって頂きました片山晃一氏、二宮美雄氏、早坂和将氏、前田友梨博士、吉田孝平氏、山本悟氏に感謝致します。

研究生生活を経済的に支援して頂きました、日本学生支援機構に感謝致します。

最後に、9年間にわたる学生生活を支えてくれた家族の深い愛情と理解に感謝致します。

本論文の完成は、以上の方々の御指導・御助力無くしては有り得なかったことを心より感謝するとともに、ここに厚く御礼申し上げます。

平成 28 年 3 月