薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (5) 443-449 (1988)

水溶性キモトリプシン阻害剤の合成研究 (第2報¹⁾)

横尾信夫,^{*,a} 服部英三,^a 平田光輝,^a 渡辺好一郎,^a

佐藤文泰,^a 永倉正彦,^a 藤井節郎^b

興和株式会社 東京研究所,^a 財団法人 大阪基礎医学研究奨励会^b

Studies on Synthesis of Water-soluble Chymotrypsin Inhibitors. II¹⁾

NOBUO YOKOO,^{*,a} EIZOU HATTORI,^a MITSUTERU HIRATA,^a KOICHIRO WATANABE,^a

FUMIYASU SATO,^a MASAHICO NAGAKURA,^a and SETSURO FUJII^b

Tokyo Research Laboratories, Kowa Co., Ltd.,^a 17-43, 2-chome, Noguchi-cho

Higashimurayama-shi, Tokyo, 189, Japan and The Osaka Foundation for

Promotion of Fundamental Medical Research,^b

11-1, 1-chome, Karasaki, Ohtsu-shi, Shiga

(Received October 27, 1987)

Water-soluble, substrate-analogous chymotrypsin inhibitors were synthesized to study the role of chymotrypsin and chymotrypsin-like enzymes *in vivo*. It was previously reported that the phenyl esters of carboxylic acids containing condensed ring such as tetralin, naphthalene, indole *etc.* showed potent inhibitory activity against chymotrypsin. In this report, the influence of several substituents on the benzene nucleus of phenyl component upon the inhibitory activity against enzymes was investigated. The esters derived from the phenol containing basic substituents in the 4 position (basic esters) exhibited potent inhibition against chymotrypsin, *e.g.* the IC_{50} value of 4-amidinophenyl tetralin-1-carboxylate was 5×10^{-7} M. But the activity of the ester obtained from the phenol containing neutral substituent in the 4 position (neutral ester) was weaker than that of the basic esters. The IC_{50} value of the neutral ester of the corresponding acyl component, 4-(*N,N*-dimethylcarbamoylmethoxycarbonylmethyl)phenyl tetralin-1-carboxylate was 7×10^{-6} M. And the acidic ester with carboxyl group on the benzene nucleus inhibited most weakly of the three, whose IC_{50} value was 6×10^{-5} M. With respect to the influence of these substituents, a similar tendency was observed in other esters derived from benzoic acid, 1-naphthylacetic acid, 3-indolylacetic acid *etc.* As for the influence of the acyl components on the inhibitory activity against chymotrypsin, the relative order was as follows: 5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetyl $\geq$ 1-naphthylacetyl $\geq$ tetralin-1-carbonyl > 3-indolylacetyl > benzoyl. 4-(4-Guanidinobenzoyloxy)phenyl esters and 4-amidinophenyl esters inhibited not only chymotrypsin but also trypsin. On the other hand, the others such as 4-(4-isopropylpiperazincarbonyl)phenyl esters inhibited chymotrypsin specifically.

Keywords—chymotrypsin inhibitor; trypsin inhibitor; naphthylacetic acid; tetralin-carboxylic acid; indoleacetic acid derivative; water-soluble phenyl ester

キモトリプシンはトリプシンと並び重要な消化酵素の1つである。トリプシン様酵素は血液凝固・線溶系の酵素として数多く生体内に存在し、その阻害剤も多数知られている。²⁾ 一方キモトリプシン様酵素は骨格筋細胞中³⁾ やマスト細胞中⁴⁾ に存在することが知られているが比較の種類は少なく、その阻害剤もまた少ない。

著者らはインスリンを蛋白分解酵素阻害剤と併用することによりその分解を防ぎ小腸より吸収させる方法を検討し、キモトリプシン阻害剤 4-(4-isopropylpiperazincarbonyl)phenyl 1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthoate methanesulfonate (FK-448) にそのような効果が認められたことを報告した。⁵⁾ このような作用と酵素阻害活性との関係を検討する目的で、また、上述のキモトリプシン様酵素の生体中の役割を検討する目的で、水溶性の、基質アナログ型の各種キモトリプシン阻害剤の合成を試みた。

キモトリプシンはフェニルアラニン、チロシン、トリプトファン等主に芳香環を有する疎水性アミノ酸に親和

性を有し、それ故にキモスタチン等既存の低分子キモトリプシン阻害剤はいずれも水に不溶性であり、*in vitro* 及び *in vivo* の実験に支障を来すことが多い。著者らは前報¹⁾において tetralin-1-carboxylic acid, 1-naphthylacetic acid, 3-indolylacetic acid の 4-substituted phenyl esters が強いキモトリプシン阻害活性を有することを報告した。今回、キモトリプシン阻害活性の IC_{50} 値を指標にして、主に phenyl component のベンゼン環 4 位置換基が、キモトリプシン阻害活性に及ぼす影響について検討した。

結 果 及 び 考 察

1. 塩基性置換基を有するフェノールのエステル (塩基性エステル) のキモトリプシン阻害活性

Chart 1 (1) a に示す方法により得られる、4 位に塩基性置換基を有するフェノール VI から Chart 1 (2) に示すように、酸クロライド法又は dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 法によりエステル Ia—Va (a 群) を合成し、キモトリプシン阻害活性を測定した (Table I)。阻害活性の IC_{50} 値から、acyl component の活性への寄与は、5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetyl $\geq$ 1-naphthylacetyl $\geq$ tetralin-1-carbonyl $>$ 3-indolylacetyl $>$ benzoyl の順

Chart 1

TABLE I. Chymotrypsin Inhibitory Activity of Phenyl Esters Type

<div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div><div><div><div><div><div></div><div></div><div></div></div></div></div><div><div><</div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div></div>						
--	--	--	--	--	--	--

Roman numeral and alphabet in parenthesis represents the number of the compound.

であった。この傾向は、前報¹⁾において得られた 4-(4-isopropylpiperazinocarbonyl)phenol から導かれるエステル IIb—IVb 及び今回合成した Vb (b 群) の場合とほぼ同じであった。一方、同じ acyl component を有するエステルにおいて、phenyl component のベンゼン環 4 位置換基の、阻害活性への寄与について考えると、a 群の活性は b 群に比し 1—2 倍と、やや強かった。これら a, b 群の化合物はいずれも塩酸塩として水に対し 10% 以上の溶解性を示した。

次にトリプシンに対し親和性を有することが知られている、⁶⁾ 強塩基性の置換基をもつフェノール、4-amidinophenol を用い Chart 1 (2) により各カルボン酸のエステル Ic—Vc (c 群) を合成し、キモトリプシン阻害活性を測定した。各 acyl component の活性への寄与は先の例とほぼ同じであったが、ベンゼン環 4 位置換基についてみると c 群の活性は a 群に比し 1—2 倍強かった。

更に、Chart 1 (1) b により、トリプシンに対する基質アナログ型阻害活性を示す⁷⁾ ことが知られている phenyl 4-guanidinobenzoate の構造をもつフェノール (VIII) を得、Chart 1 (2) により、強塩基性置換基を有するエステル Id, IIId, IVd (d 群) に導き、キモトリプシン阻害活性を測定したところ、これら d 群の化合物はこれまで得られた群の中で最も強い活性を示した。

2. 酸性置換基を有するフェノールのエステル (酸性エステル) のキモトリプシン阻害活性

Chart 1 (3) に示す方法により 4-carboxyphenyl esters IIe, Ve (e 群) を合成し、キモトリプシン阻害活性を測定した。IIe, Ve はともに 6×10^{-5} M の IC_{50} 値を示し、先に得られたそれぞれに対応する塩基性エステル IIa, Va (IC_{50} 値: 5×10^{-7} , 4×10^{-7} M) の阻害活性に比較すると約 1/100 の強さであった (Table I)。

3. 中性置換基を有するフェノールのエステル (中性エステル) のキモトリプシン阻害活性

4 位に中性の置換基 *N,N*-dimethylcarbamoylmethoxycarbonylmethyl 基を有するフェノール⁸⁾ から Chart 1 (2) によりエステル IIIf, Vf (f 群) を合成しキモトリプシン阻害活性を測定したところ、それぞれ対応する塩基性エステル IIa, Va の約 1/10 の強さであった。また、無置換フェニルエステル Ig, IIIf, IVg (g 群) の活性も対応する a 群の化合物に比較し約 1/10 の強さであり、これら中性エステルの活性は酸性エステル、塩基性エステル

TABLE II. Trypsin Inhibitory Activity of Phenyl Esters Type

$R_1-COO-\text{C}_6\text{H}_4-R_2$		
R ₁	Inhibitory activity IC_{50} (M)	
	R ₂	
	$-C \begin{array}{l} \nearrow NH_2 \\ \searrow NH \end{array}$	$-OCO-\text{C}_6\text{H}_4-NHC \begin{array}{l} \nearrow NH_2 \\ \searrow NH \end{array}$
(Ic) 4×10^{-6}	(Id) 6×10^{-8}
(IIc) 6×10^{-7}
(IIIc) 7×10^{-7}	(IIId) 8×10^{-8}
(IVc) 6×10^{-6}	(IVd) 9×10^{-8}
(Vc) 3×10^{-8}	

Roman numeral and alphabet in parenthesis represents the number of the compound.

の中間の値を示した (Table I).

4. トリプシン阻害活性

上に述べた a 群から g 群までのすべての化合物についてトリプシン阻害活性を測定した. グアニジノ安息香酸フェニルエステル Id, IIId, IVd のトリプシン阻害活性の IC_{50} 値はそれぞれ 6×10^{-8} , 8×10^{-8} , 9×10^{-8} M と、いずれも強い活性を示した. トリプシンのアシル化速度が速く、また、いずれの化合物から同じ 4-guanidinobenzoyl trypsin を生じたことによるものと考えられた.⁹⁾ 一方、c 群のアミジノフェニルエステルもトリプシン阻害活性を示したが、これらの化合物の IC_{50} 値は 4×10^{-8} (Ic) から 3×10^{-8} M (Vc) と大きな差がみられた (Table II). 逆性基質型化合物によるトリプシンのアシル化においては生成するアシル化トリプシンは各化合物により異なりそれぞれのアシル基の脱アシル化速度によって阻害活性は大きな影響を受けた結果と考えられた.⁹⁾ なお、Vc の IC_{50} 値は d 群の値とほぼ同じレベルにあり、トリプシンとどのような形で安定なアシル中間体を形成しているか興味を持たれるところである. また、上記以外の群にはトリプシン阻害活性の IC_{50} 値が 1×10^{-4} M 以下の値を示す化合物は見出されなかった.

実 験 の 部

N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-4-hydroxybenzamide (VI) の合成 Methyl 4-hydroxybenzoate 9.10 g (0.06 mol) に *N,N*-dimethylethylenediamine 10.55 g (0.12 mol) を加え、 150°C に 20 時間加熱攪拌した. 冷後反応液を濃縮し、AcOEt を加えて得た粗結晶をアセトンから再結晶し、5.95 g (48%) の VI を得た. mp $118-121^{\circ}\text{C}$ (未補正、以下すべて同様). Anal. Calcd $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 63.44; H, 7.74; N, 13.45. Found: C, 63.25; H, 7.55; N, 13.26.

4-Hydroxyphenyl 4-Guanidinobenzoate (VIII) の合成 4-Guanidinobenzoic acid 11.82 g (0.066 mol) に SOCl_2 57.8 ml を加え、 80°C 30 分加熱後 *n*-ヘキサンを加え、酸クロライド塩酸塩の結晶を得た. ピリジン 100 ml に hydroquinone monobenzyl ether 16.01 g (0.08 mol) を溶解し、氷冷下酸クロライドを加えた. 反応液が透明になってから室温で 90 分間攪拌した. 飽和 NaHCO_3 溶液を加え析出した結晶を濾取し、水及びアセトンで洗った後酢酸に溶かし石油エーテルを加え 4-benzoyloxyphenyl 4-guanidinobenzoate (VII) の酢酸塩 21.8 g (82.1%) を得た. mp $151.5-153^{\circ}\text{C}$. Anal. Calcd $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_8 \cdot \text{CH}_3\text{COOH}$: C, 65.55; H, 5.50; N, 9.97. Found: C, 65.34; H, 5.47; N, 9.69. 次に上記 VII 7.6 g (0.018 mol) を酢酸 170 ml に溶かし Pd-C を加え室温にて H_2 を通じ還元した. 2 時間後熱時濾過し触媒を除き、冷後石油エーテルを加え VIII の酢酸塩を得るが、塩交換を行い HCl 塩 4.26 g (77.0%) を得た. mp $224.5-227.5^{\circ}\text{C}$. Anal. Calcd $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{N}_5\text{O}_8 \cdot \text{HCl}$: C, 54.64; H, 4.59; N, 13.65. Found: C, 54.31; H, 4.79; N, 13.29.

Chart 1 (2) に示す、これらフェノールとカルボン酸の縮合は文献 1) の方法に従って行った. なお、indole-acetic acid の反応には DCC 法を、その他のカルボン酸の反応には酸クロライド法を用いた.

4-(1,2,3,4-Tetrahydro-1-naphthoyloxy)benzoic Acid (IIe) の合成 Benzyl 4-hydroxybenzoate 11.46 g (0.05 mol) 及び Et_3N 8.4 ml (0.06 mol) を 150 ml の AcOEt に溶解し氷冷した. 別途に、1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthoic acid 10.57 g (0.06 mol) に SOCl_2 15 ml を加え 2 時間加熱還流して得た酸クロライドを、上記溶液中に加え室温で 2 時間攪拌した. 生じた不溶物を濾去し、1 N HCl, NaHCO_3 水溶液、 H_2O で洗い、乾燥後溶媒を溜去すると benzyl 4-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthoyloxy)benzoate (IX) を得た. IX 10.4 g を EtOH 100 ml に溶解し 10% Pd-C 1 g を加え 2 時間接触還元した後触媒を濾去し、濃縮後得られた結晶を EtOH から再結晶し IIe 4.9 g (61.5%) を得た. mp, 元素分析の結果は Table III にまとめた.

Ve については benzyl 4-hydroxybenzoate と 5-methoxy-2-methyl-3-indolylacetic acid を前報¹⁾と同様の DCC 法により縮合を行い以下 IIe と同様に接触還元を行い目的物を得た. 得られたエステルの収率, 融点, 元素分析の結果は Table III にまとめた.

キモトリプシン阻害活性の測定¹⁰⁾ 検体の dimethyl sulfoxide 溶液 0.1 ml に pH 8.0, 0.1 M のトリス HCl バッファー 0.1 ml 及び同バッファーに溶解した $10 \mu\text{g/ml}$ のキモトリプシン (bovine, Boehringer Mannheim 社製) 溶液 0.1 ml を加え 37°C に加温した. 10 分後 25 mM の *N*-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (Sigma 社製) 溶液 0.2 ml を加え 37°C に 30 分反応させた. 2 M ヒドロキシルアミン HCl 水溶液と 3.5 M NaOH の等量混液 0.75 ml を加え 37°C 15 分反応後冷却し 18% trichloroacetic acid, 4 N HCl 及び 10% FeCl_3 溶液各 0.5 ml を加え、分光光度計を用い測定した 530 nm における吸光度から阻害率を求め、計算により用いた酵素の 50% を阻害するに要する検体の濃度 IC_{50} を求めた.

TABLE III. Yields and Physical Properties of Compounds

Compound	Formula	Recrystallizing solvent	Yield (%)	mp (°C)	Elemental analysis (%)		
					Calcd	Found	
					C	H	N
Ia	$C_{18}H_{20}N_2O_3 \cdot HCl$	$CHCl_3$ -AcOEt	23	174—178	61.98 (61.48)	6.07 5.95	8.03 7.90
Id	$C_{21}H_{17}N_3O_4 \cdot HCl \cdot H_2O$	DMF-AcOEt	53	222—225	58.68 (59.08)	4.69 4.36	9.78 9.99
IIa	$C_{22}H_{28}N_2O_3 \cdot HCl$	Acetone	46	153—156	65.58 (65.30)	6.75 6.94	6.95 6.95
IIc	$C_{18}H_{18}N_2O_2 \cdot CH_3SO_3H$	MeOH-Et ₂ O	23	177—180	58.45 (58.49)	5.68 5.58	7.17 7.18
IIf	$C_{18}H_{16}O_4$	EtOH	62	140—144	72.96 (72.48)	5.44 5.41	— —)
IIg	$C_{23}H_{25}NO_5$	AcOEt-Et ₂ O	85	90— 93	69.86 (69.62)	6.37 6.36	3.54 3.37
IIIa	$C_{23}H_{24}N_2O_8$	AcOEt-pet. ether	46	126—128	73.38 (73.14)	6.43 6.33	7.44 7.47
IIIc	$C_{19}H_{16}N_2O_2 \cdot CH_3SO_3H$	MeOH-Et ₂ O	26	197—199	59.99 (59.98)	5.03 4.95	7.00 7.05
IIId	$C_{26}H_{21}N_3O_4 \cdot HCl$	Acetone	9	158—160	65.62 (65.75)	4.66 4.53	8.83 8.79
IIIg	$C_{18}H_{14}O_2$	Et ₂ O-hexane	24	60— 61.5	82.42 (82.39)	5.38 5.24	— —)
IVa	$C_{21}H_{23}N_3O_8 \cdot HCl$	MeOH-Et ₂ O	22	176—178	62.76 (62.75)	6.02 5.97	10.46 10.41
IVc	$C_{17}H_{15}N_3O_2 \cdot CH_3SO_3H$	MeOH-Et ₂ O	31	223—226	55.52 (55.51)	4.92 4.98	10.79 10.80
IVd	$C_{24}H_{20}N_4O_4 \cdot HCl$	DMF-AcOEt	22	196—198	62.00 (62.00)	4.55 4.32	12.05 12.01
IVg	$C_{16}H_{13}NO_2$	Et ₂ O-pet. ether	20	72— 74	76.48 (76.57)	5.21 5.10	5.57 5.54
Va	$C_{23}H_{27}N_3O_4 \cdot \begin{array}{c} CH-COOH \\ \\ CH-COOH \end{array}$	EtOH	77	151—153	61.71 (61.65)	5.95 5.95	8.00 7.78
Vb	$C_{26}H_{31}N_3O_4 \cdot HCl$	EtOH-AcOEt-Et ₂ O	73	174—175	64.26 (63.90)	6.64 6.58	8.65 8.27
Vc	$C_{19}H_{19}N_3O_3 \cdot HCl$	MeOH-Et ₂ O	24	188—193	61.04 (61.02)	5.39 5.41	11.24 11.40
Ve	$C_{19}H_{17}NO_5$	AcOEt-Et ₂ O-hexane	18	166—168	67.25 (67.26)	5.05 5.02	4.13 4.06
Vf	$C_{24}H_{28}N_2O_6$		29	(oil)	65.74 (65.32)	5.98 5.69	6.39 5.96

DMF, dimethylformamide.

トリプシン阻害活性の測定¹⁾ 上記に準じて測定した。但し、バッファーは 10 mM の $CaCl_2$ を含む上記バッファー、酵素はトリプシン (bovine, Boehringer Mannheim 社製) 2.5 μ g/ml, 基質は 25 mM の *N*-tosyl-L-arginine methyl ester·HCl (蛋白質研究奨励会製) 溶液を用いた。

引用文献

- 1) 横尾信夫, 服部英三, 平田光輝, 渡辺好一郎, 佐藤文泰, 永倉正彦, 藤井節郎, 薬誌, **107**, 732 (1987) を第 1 報とする。

- 2) a) M. Muramatu, S. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, **268**, 221 (1972); b) T. Aoyama, T. Okutome, T. Nakayama, T. Yaegashi, R. Matsui, S. Nunomura, M. Kurumi, Y. Sakurai, S. Fujii, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1458 (1985).
- 3) Y. Sanada, N. Yasogawa, N. Katunuma, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **82**, 108 (1978).
- 4) B. Schick, K. F. Austen, L. B. Schwartz, *J. Immunol.*, **132**, 2571 (1984).
- 5) S. Fujii, T. Yokoyama, K. Ikegaya, F. Sato, N. Yokoo, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 545 (1985).
- 6) K. Tanizawa, A. B. McLaren, W. B. Lawson, Y. Kanaoka, *Chem. Pharm. Bull.*, **34**, 913 (1986).
- 7) Y. Tamura, M. Hirado, K. Okamura, Y. Minato, S. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, **484**, 417 (1977).
- 8) ONO Pharmaceutical Co., Ltd., Ger. Patent 2548886 (1976) [*Chem. Abstr.*, **85**, 32666 (1976)].
- 9) a) M. Mares-Guia, E. Shaw, *J. Biol. Chem.*, **242**, 5782 (1967); b) 藤井節郎, 平戸政行, 代謝, **14**, 1087 (1977).
- 10) M. Muramatu, S. Shiraishi, S. Fujii, *Biochim. Biophys. Acta*, **285**, 224 (1972).
- 11) M. Muramatu, S. Fujii, *J. Biochem.*, **64**, 807 (1968).
- 12) F. Markwardt, J. Drawert, P. Walsmann, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2247 (1974).