

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 38/05

C07K 5/04 C07C229/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95196204.3

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 15 日

[11] 授权公告号 CN 1166403C

[22] 申请日 1995. 11. 14 [21] 申请号 95196204.3

[30] 优先权

[32] 1994. 11. 14 [33] US [31] 08/337,795

[32] 1995. 6. 5 [33] US [31] 08/464,398

[32] 1995. 11. 3 [33] US [31] 08/552,794

[86] 国际申请 PCT/US1995/014921 1995. 11. 14

[87] 国际公布 WO1996/014857 英 1996. 5. 23

[85] 进入国家阶段日期 1997. 5. 14

[71] 专利权人 赛福伦公司

地址 美国宾夕法尼亚

[72] 发明人 穆罕默德·伊克巴尔

詹姆斯·迪博尔德 罗伯特·西曼

桑卡尔·查特吉 詹姆斯·C·考尔

审查员 周 静

[74] 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责
任公司

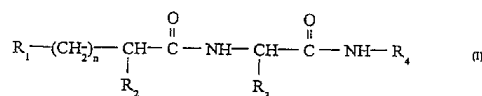
代理人 丁业平

权利要求书 6 页 说明书 69 页 附图 7 页

[54] 发明名称 多相催化蛋白酶的抑制剂

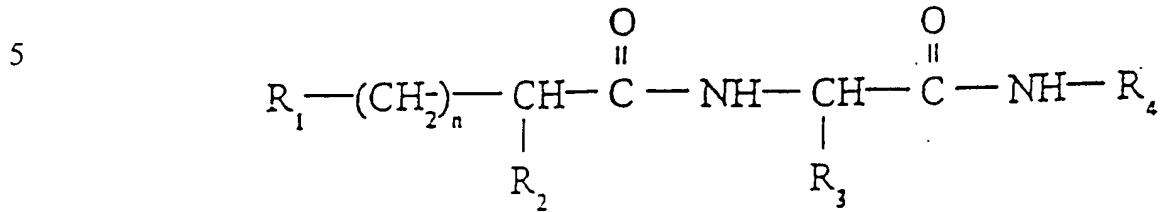
[57] 摘要

本文公开了由通式(I)所表示的多相催化蛋白酶的抑制剂。还公开了组成成员及优选的组成成员。制备和使用所披露化合物的方法也在本文中公开。



ISSN 1008-4274

1. 通式如下的化合物:



其中,

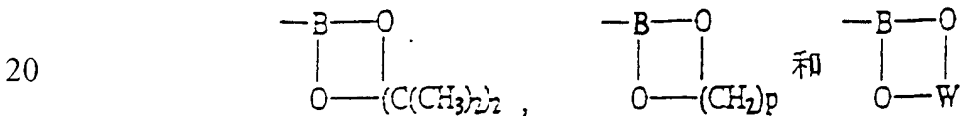
10 R_1 选自 $-C \equiv N$ 、 $-C(=O)OR_9$ 、苯二甲酰亚氨基、 $-NH-SO_2R_9$ 和 $-NH-$
J;

R_2 选自 H、和具有 3 至 7 个碳原子的环烷基;

R_3 选自 $-(CH_2)_m-NH-C(=N-R_5)-NH_2$ 、 $-R_6-NO_2$ 、 $-R_6-J$ 和 $-R_6-CN$;

R_4 为 $-CH(CH_2-R_7)-Q$;

15 Q 选自 $-CH-R_8$ 、 $-C(=O)CH_2Cl$ 、 $-C(=O)CH_2Br$ 、
 $-C(=O)CH_2F$ 、 $-C(=O)CHF_2$ 、 $-C(=O)CF_3$ 、
 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、 $-B(OH)_2$ 、



其中 p 为 2 或 3;

w 为环烷基;

25 R_5 选自 $-NO_2$ 、 $-CN$ 和 $-J$;

R_6 为 $-(CH_2)_m-NH-C(=NH)-NH-$;

R_7 选自苯基和具有 1 至 8 个碳原子的烷基, 所述烷基可被一个或多个卤原子或苯基任意取代;

30 R_8 选自 $=O$ 、 $=N-NHC(=O)-NH_2$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-OCH_3$ 、 $=N-O-CH_2-$
 C_6H_5 、 $=NNH-C(=S)-NH_2$ 和 $=N-NH-J$;

R_9 选自氢和具有 1 至 6 个碳原子的烷基, 所述烷基被一个或多个卤原子或苯基取代;

J 为保护基团;

n 为 3 至 10 的整数; 以及

35 m 为 2 至 5 的整数。

2. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 R_1 选自 $-C\equiv N$ 、 $-C(=O)OCH_3$ 、
苯二甲酰亚氨基和 $-NH-SO_2CF_3$ 。

5 3. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 R_2 选自氢和环戊烷基。

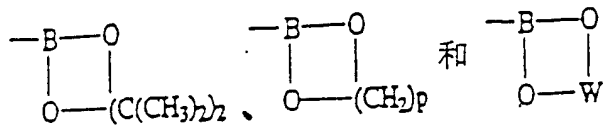
4. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 R_3 为 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-R_5)-NH_2$ 。

10 5. 权利要求 4 的化合物, 其特征在于 R_5 选自 $-NO_2$ 、 CN 、 $-PMC$ 、 $-MTR$ 、 $-MTS$ 和 Tos 。

6. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 R_7 选自 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-(CH_2)_2-CH_3$ 和 $-C_6H_5$ 。

15 7. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 Q 为 $-CH-R_8$ 。

8. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 Q 选自 $-C(=O)CH_2Cl$ 、 $-C(=O)CH_2Br$ 、
20 $-C(=O)CH_2F$ 、 $-C(=O)CHF_2$ 、 $-C(=O)CF_3$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、 $-B(OH)_2$ 、



25 9. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 Q 选自 $-CH-R_8$ 、 $-B(OH)_2$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、
 $\begin{array}{c} \text{—B—O} \\ | \quad | \\ \text{O—(C(CH}_3)_2)_2 \end{array}$ 和 $\begin{array}{c} \text{—B—O} \\ | \quad | \\ \text{O—(CH}_2)_p \end{array}$ 。

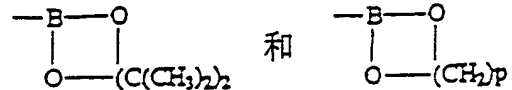
30 10. 权利要求 7 的化合物, 其特征在于 R_8 选自 $=O$ 、 $=N-NHC(=O)-NH_2$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-OCH_3$ 、 $=N-O-CH_2-C_6H_5$ 和 $=NNH-C(=S)-NH_2$ 。

11. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 R_1 选自 $-C(=O)OCH_3$ 、苯二甲酰亚氨基和 $-NHSO_2CF_3$; R_2 为环戊烷基; R_3 为 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 为 $=O$ 。

35

12. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 为 $=O$ 。

5 13. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 选自 $-B(OH)_2$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、



10 以及 R_7 选自 $-CH(CH_3)_2$ 和 $-CH_2-CH_3$ 。

14. 权利要求 1 的化合物, 其特征在于 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 选自 $=N-NHC(=O)-NH_2$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-OCH_3$ 和 $=N-O-CH_2-C_6H_5$ 。

15 15. 一种药物组合物, 其含有权利要求 1 所述的化合物。

20 16. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 R_1 选自 $-C\equiv N$ 、 $-C(=O)OCH_3$ 、苯二甲酰亚氨基和 $-NH-SO_2CF_3$ 。

17. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 R_2 选自氢和环戊烷基。

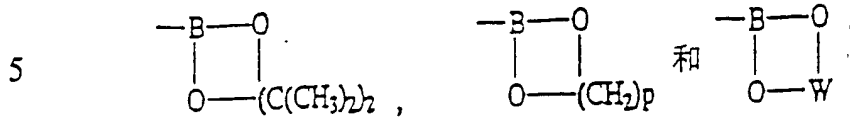
25 18. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 R_3 为 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-R_5)-NH_2$ 。

30 19. 权利要求 18 所述的药物组合物, 其中 R_5 选自 $-NO_2$ 、 CN 、 $-PMC$ 、 $-MTR$ 、 $-MTS$ 和 Tos 。

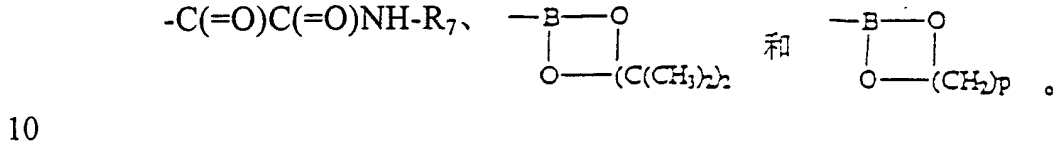
20. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 R_7 选自 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-(CH_2)_2-CH_3$ 和 $-C_6H_5$ 。

35 21. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 Q 为 $-CH-R_8$ 。

22. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 Q 选自 $-C(=O)CH_2Cl$ 、 $-C(=O)CH_2Br$ 、 $-C(=O)CH_2F$ 、 $-C(=O)CHF_2$ 、 $-C(=O)CF_3$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、 $-B(OH)_2$ 、



23. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 Q 选自 $-CH-R_8$ 、 $-B(OH)_2$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、



24. 权利要求 21 所述的药物组合物, 其中 R_8 选自 $=O$ 、 $=N-NHC(=O)-NH_2$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-OCH_3$ 、 $=N-O-CH_2-C_6H_5$ 和 $=NNH-C(=S)-NH_2$ 。

15

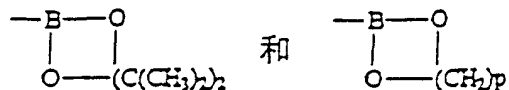
25. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 R_1 选自 $-C(=O)OCH_3$ 、苯二甲酰亚氨基和 $-NHSO_2CF_3$; R_2 为环戊烷基; R_3 为 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 为 $=O$ 。

20

26. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 为 $=O$ 。

25

27. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 选自 $-B(OH)_2$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、



30

以及 R_7 选自 $-CH(CH_3)_2$ 和 $-CH_2-CH_3$ 。

28. 权利要求 15 所述的药物组合物, 其中 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 选自 $=N-NHC(=O)-NH_2$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-OCH_3$ 和 $=N-O-CH_2-C_6H_5$ 。

35

29. 权利要求 1 所述的化合物在制备药物中的用途, 其中所述药物是抑制多相催化蛋白酶活性、减少肌肉物质损失、治疗肌肉消耗性疾病、减少过氧化物歧化酶的降解或治疗其特征在于过氧化物歧化酶的活性减低的疾病的药物。

30. 权利要求 29 所述的用途, 其中 R_1 选自 $-C\equiv N$ 、 $-C(=O)OCH_3$ 、苯二甲酰亚氨基和 $-NH-SO_2CF_3$ 。

31. 权利要求 29 所述的用途, 其中 R_2 选自氢和环戊烷基。

32. 权利要求 29 所述的用途, 其中 R_3 为 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-R_5)-NH_2$ 。

33. 权利要求 32 所述的用途, 其中 R_5 选自 $-NO_2$ 、 CN 、 $-PMC$ 、 $-MTR$ 、 $-MTS$ 和 Tos 。

34. 权利要求 29 所述的用途, 其中 R_7 选自 $-CH(CH_3)_2$ 、 $-(CH_2)_2-CH_3$ 和 $-C_6H_5$ 。

35. 权利要求 29 所述的用途, 其中 Q 为 $-CH-R_8$ 。

36. 权利要求 29 所述的用途, 其中 Q 选自 $-C(=O)CH_2Cl$ 、 $-C(=O)CH_2Br$ 、 $-C(=O)CH_2F$ 、 $-C(=O)CHF_2$ 、 $-C(=O)CF_3$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、 $-B(OH)_2$ 、 $\begin{array}{c} -B-O \\ | \quad | \\ O-(C(CH_3)_2)_2 \end{array}$ 、 $\begin{array}{c} -B-O \\ | \quad | \\ C-(CH_2)_p \end{array}$ 和 $\begin{array}{c} -B-O \\ | \quad | \\ O-W \end{array}$

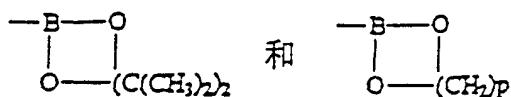
37. 权利要求 29 所述的用途, 其中 Q 选自 $-CH-R_8$ 、 $-B(OH)_2$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、 $\begin{array}{c} -B-O \\ | \quad | \\ O-(C(CH_3)_2)_2 \end{array}$ 和 $\begin{array}{c} -B-O \\ | \quad | \\ O-(CH_2)_p \end{array}$

38. 权利要求 35 所述的用途, 其中 R_8 选自 $=O$ 、 $=N-NHC(=O)-NH_2$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-OCH_3$ 、 $=N-O-CH_2-C_6H_5$ 和 $=NNH-C(=S)-NH_2$ 。

39. 权利要求 29 所述的用途, 其中 R_1 选自 $-C(=O)OCH_3$ 、苯二甲酰亚氨基和 $-NHSO_2CF_3$; R_2 为环戊烷基; R_3 为 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 为 $=O$ 。

5 40. 权利要求 29 所述的用途, 其中 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 为 $=O$ 。

10 41. 权利要求 29 所述的用途, 其中 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 选自 $-B(OH)_2$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、



15

以及 R_7 选自 $-CH(CH_3)_2$ 和 $-CH_2-CH_3$ 。

20 42. 权利要求 29 所述的用途, 其中 R_1 为 $-C\equiv N$; R_2 为环戊烷基; R_3 选自 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-NO_2)-NH_2$ 和 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-J)-NH_2$; Q 为 $-CH-R_8$; R_7 为 $-CH(CH_3)_2$; 以及 R_8 选自 $=N-NHC(=O)-NH_2$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-OCH_3$ 和 $=N-O-CH_2-C_6H_5$ 。

多相催化蛋白酶的抑制剂

5

相关申请的相互参考

本申请是 1995 年 6 月 5 日申请、申请序号为 464,398 的美国申请的部分后续申请，而后一申请又是 1994 年 11 月 14 日申请、申请序号为 337,795 的美国申请的部分后续申请。

10

发明领域

本发明涉及多相催化蛋白酶抑制剂、包括这些抑制剂的组合物和用 MCP 抑制剂，例如，阻抑在各种生理状态发生的肌肉物质损失的方法。

15

发明背景

真核细胞经常降解，而且细胞内的蛋白质也经常置换。这使细胞可选择性地和快速地去掉具有异常构相的蛋白质和肽，通过调节调控肽的量来控制代谢途径，以及在必要时，如在饥饿时，为供能而提供氨基酸。参见 Goldberg, A.L. & St. John, A.C. Annu. Rev. Biochem.(年度生化回顾)45:747-803(1976)。哺乳动物的细胞机制使蛋白质降解有多条途径。这些途径中的一些需要三磷酸腺苷(ATP)形式能量的输入。参见 Goldberg, A.L. & St. John, 期卷同上文。

20

25

30

多相催化蛋白酶(MCP,一般也被称为蛋白酶体(proteasome)、多相催化蛋白酶复合体、多相内肽酶复合体、20S蛋白酶体和 ingensin)是大分子量(700kD)的真核非溶酶体蛋白酶复合体，它至少在将蛋白质降解为肽和氨基酸的两条细胞途径中起作用。参见 Orłowski, M. Biochemistry (生物化学)29(45) 10289-10297(1990)。该复合体具有至少三个不同的水解活性类型：(1)胰蛋白酶样活性类型，其中的肽键在碱性氨基酸的羧基端断裂；(2)胰凝乳蛋白酶样活性类型，其中的肽键在疏水氨基酸的羧基端断裂；以及(3)其中的肽键在谷氨酸的羧基端断裂的活性类型。参见 Rivertt, A.J. J. Biol. Chem. (生物学化学期刊) 264:21 12215-12219(1989)和 Orłowski, 期卷同上文。

涉及 MCP 的蛋白质水解的一条途径也涉及多肽"遍在蛋白质"。Hershko, A. & Crechavh, A. *Annu. Rev. Biochem.*(年度生化回顾) 51:335-364(1982)。需要 MCP、ATP 和遍在蛋白质的该途径在生长的成纤维细胞和成熟网状细胞中负责高度异常的蛋白质、某些短寿命的正常蛋白质和蛋白质本体的降解。参见 Driscoll, J. and Goldberg, A.L. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*(美国自然科学进展) 86: 787-791(1989)。被该途径降解的蛋白质以依赖 ATP 的方式通过其赖氨酸的氨基与遍在蛋白质共价结合。然后, 遍在蛋白质结合的蛋白质通过 ATP 依赖的蛋白酶复合体, 被 26S 蛋白酶体降解成小肽, 所述 26S 蛋白酶体含有作为其蛋白水解核心的 MCP。Goldberg, A.L. & Rock, K.L. *Nature* 357:375-379 (1992)。

还描述了需要 MCP 和 ATP 而不需要遍在蛋白质的第二种途径。参见 Driscoll, J. and Goldberg, A.L., 期卷同上文。在该过程中, MCP 以依赖 ATP 的方式降解蛋白质。参见 Driscoll, J. and Goldberg, A.L., 期卷同上文。该过程已在骨骼肌中观察到。参见 Driscoll, J. and Goldberg, A.L., 期卷同上文。然而, 还有人建议, 在肌肉中 MCP 与另外的蛋白酶 multipain 协同作用, 因此导致肌肉蛋白质的加速降解。参见 Goldberg & Rock, 期卷同上文。

已有报道说 MCP 通过蛋白水解机制起作用, 该机制的活性位点亲核物质是 N-末端的苏氨酸残基的羟基。因此, MCP 是已知的苏氨酸蛋白酶的第一个例子。参见 Seemuller, et al., *Science* (科学) (1995) 268 579-582; Goldberg, A.L., *Science* (科学) (1995) 268 522-523。

细胞蛋白质合成和降解途径的相对活性决定了蛋白质是积累下来还是被损失掉了。蛋白质物质的异常损失与数种疾病状态如肌肉营养不良、心性恶病质、肺气肿、麻风病、营养不良、骨软化、幼儿急性白血病和癌恶病质有关。在老年化、长期住院或长期卧病在床和慢性背下部疼痛的患者中也观察到肌肉物质的损失。

由于去神经或废用, 骨骼肌将快速萎缩, 导致其大小、蛋白质含量和收缩力的显著下降。该萎缩是人类许多神经肌肉疾病的重要组成。蛋白质降解的增多被看做是去神经萎缩中的肌肉消耗的主要原因。Furono, K. et al. *J. Biochem.* (生化期刊) 265/15:8550-8557(1990)。虽然还未鉴定出涉及肌肉中的蛋白质水解的特定过程, 已有证据表明 MCP 与

肌肉蛋白质的加速降解相关。参见，例如，Furono，期卷同上文，和 PCT 公开申请 WO 92/20804 (公开日为 1992 年 11 月 26 日)。

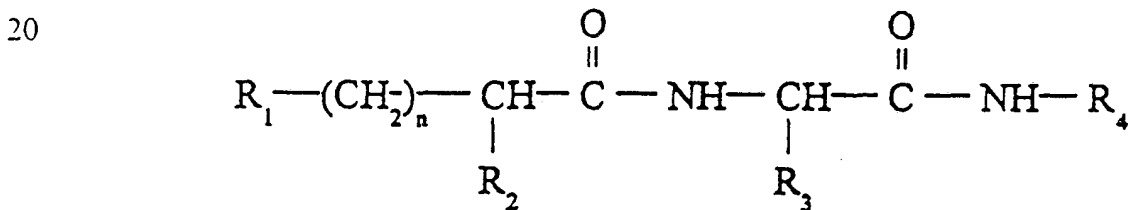
5 数种疾病状态涉及 MCP 活性。例如，已有报道在人白血病细胞系中有异常高的 MCP 表达。Kumatori, A. et al. PNAS 87:7071(1990)。还报道在患全身性红斑狼疮(SLE)的患者体中有抗 MCP 的自身抗体。Arribas, J. et al. J. Exp. Med. (医学实验期刊) 173: 423-427(1990)。

10 需要能抑制 MCP 复合体的试剂；所述试剂为进行例如 MCP 活性和医学领域的研究人员提供了有价值的工具，以便例如控制异常 MCP 活性的有害作用。本发明正是针对这些重要目的的。

发明概述

15 本发明针对新颖的多相催化蛋白酶("MCP")抑制剂。本发明的主题还包括抑制与 MCP 有关的某些紊乱(包括治疗肌肉消耗性疾病)的方法。

本发明的一方面提供具有下列通式的化合物：



25

组成成员以及优选的组成成员在下文定义。

30 本发明的化合物可用于各种应用。例如，为在机制上理解 MCP 途径和通过 I 类主要组织相容性抗原复合体(MHC I)途径显现肽抗原，可用该化合物来研究以进一步细化和发展体内和体外的模型。

35 在临床应用方面，可用含有要求被保护化合物的组合物来抑制 MCP 活性、减少肌肉物质的损失、治疗肌肉消耗性疾病、减少过氧化物歧化酶的降解和治疗特征在于过氧化物歧化酶活性减低的紊乱。

还公开了制备本发明化合物的方法。

随着本发明的继续公开,该化合物的这些和其它特征将进一步地显现出来。

5

附图的简要说明

图 1 显示本文公开的 MCP 抑制剂对 M12.B6 细胞加工电穿孔的 OVA 的作用效果。

10

图 2 显示 OVA 的浓度对本发明实施方案加工过程的抑制效果。

图 3 显示 OVA 的浓度对本发明实施方案加工过程的抑制效果。

15

图 4 显示了定义 SOD-1 基因以及 FALS 突变、限制性位点和 PCR 引物位置的物理图谱。

图 5 显示与 5 μ M 本发明的 MCP 抑制剂温育后对瞬间转染的 293 细胞内的 SOD-1 含量的定量。

20

图 6 显示各种 SOD-1 的同型物对本发明实施方案的剂量反应。

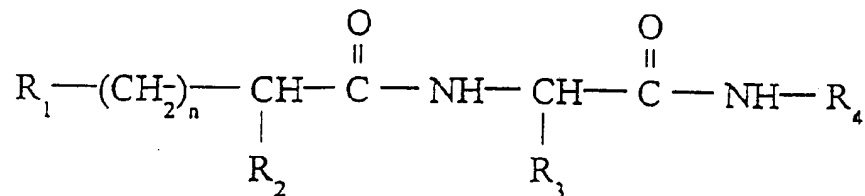
图 7 显示 SOD-1 的产量是 MCP 活性的函数。

优选实施方案的详细说明

25

本发明提供 MCP 抑制剂、包括这些抑制剂的组合物以及使用这些抑制剂的方法。本发明的 MCP 抑制剂,例如,由下列通式代表:

30



35

其中,

R_1 选自 $-C \equiv N$ 、 $-C(=O)OR_9$ 、苯二甲酰亚氨基、 $-NH-SO_2R_9$ 和 $-NH-J$;

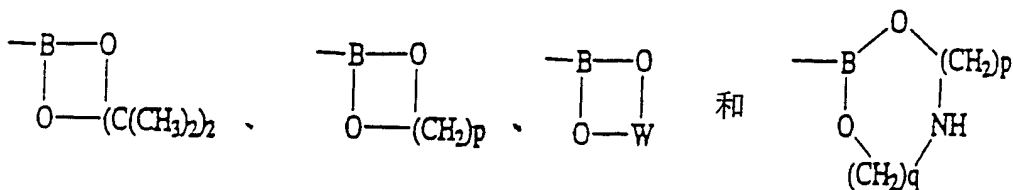
R_2 选自 H、羟基、具有 1 至 10 个碳原子的烷基和具有 3 至 7 个碳原子的环烷基;

5 R_3 选自 $-(CH_2)_m-NH-C(=N-R_5)-NH_2$ 、 $-R_6-NO_2$ 、 $-R_6-J$ 和 $-R_6-CN$;

R_4 为 $-CH(CH_2-R_7)-Q$;

Q 选自 $-CH-R_8$ 、 $-C(=O)CH_3$ 、 $-C(=O)CH_2Cl$ 、 $-C(=O)CH_2Br$ 、
 $-C(=O)CH_2F$ 、 $-C(=O)CHF_2$ 、 $-C(=O)CF_3$ 、 $-C(=O)C(=O)R_7$ 、
 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、 $-C(=O)CO_2-R_7$ 、 $-C(=O)CO_2H$ 、 $-B(OH)_2$ 、

10



15

其中 p 和 q 独立地为 2 或 3;

w 为环烷基;

R_5 选自 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、和 $-J$;

R_6 为 $-(CH_2)_m-NH-C(=NH)-NH-$;

20 R_7 选自苯基、具有 1 至 8 个碳原子的烷基，所述烷基可被一个或多个卤原子、芳基、或杂芳基任意取代;

R_8 选自 $=O$ 、 $=N-NHC(=O)-NH_2$ 、 $=N-OH$ 、 $=N-OCH_3$ 、 $=N-O-CH_2-C_6H_5$ 、
 $=NNH-C(=S)-NH_2$ 、和 $=N-NH-J$;

R_9 选自氢、和具有 1 至 6 个碳原子的烷基，所述烷基可被一个或多个卤原子、芳基或杂芳基任意取代;

25

J 为保护基团;

n 为 3 至 10 的整数; 以及

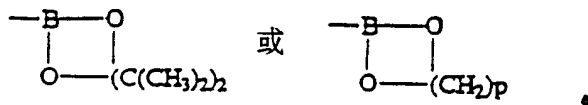
m 为 2 至 5 的整数。

30 在一些优选的实施方案中, R_1 是 $-C \equiv N$ 、 $-C(=O)OCH_3$ 、苯二甲酰亚氨基、或 $-NH-SO_2CF_3$; 以及在其它优选的实施方案中, R_2 是氢和环戊烷基。

R_3 优选为 $-(CH_2)_3-NH-C(=N-R_5)-NH_2$ 。

35

Q 优选为 $-CH-R_8$ 、 $-B(OH)_2$ 、 $-C(=O)C(=O)NH-R_7$ 、或具有下列结构的基团:



5 R_5 优选为 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{PMC}$ 、 $-\text{MTR}$ 、 $-\text{MTS}$ 或 Tos 。

R_7 优选为 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、或 $-\text{C}_6\text{H}_5$ 。

10 R_8 优选为 $=\text{O}$ 、 $=\text{N}-\text{OH}$ 、 $=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、 $=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ 、 $=\text{NNH}$
 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}_2$ 、 $=\text{NNH}-\text{C}(=\text{S})-\text{NH}_2$ 。

在一些优选的实施方案中， R_1 为 $-\text{C}(=\text{O})\text{OCH}_3$ 、苯二甲酰亚氨基或
 $-\text{NH}-\text{SO}_2\text{CF}_3$ ； R_2 为环戊烷基； R_3 为 $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(=\text{N}-\text{NO}_2)-\text{NH}_2$ ； R_7 为
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ；以及 R_8 为 $=\text{O}$ 。

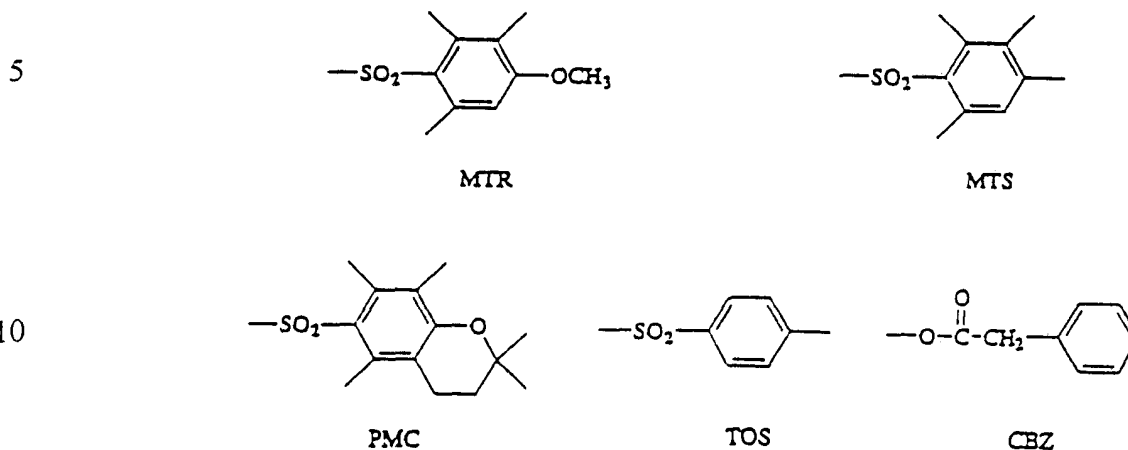
15 在其它优选的实施方案中， R_1 为 $-\text{C} \equiv \text{N}$ ； R_2 为环戊烷基； R_3 为
 $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(=\text{N}-\text{NO}_2)-\text{NH}_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(=\text{N}-\text{J})-\text{NH}_2$ ； R_7 为
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ；以及 R_8 为 $=\text{O}$ 。

20 在进一步优选的实施方案中， R_1 为 $\text{C} \equiv \text{N}$ ； R_2 为环戊烷基； R_3 为
 $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(=\text{N}-\text{NO}_2)-\text{NH}_2$ 或 $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(=\text{N}-\text{J})-\text{NH}_2$ ； R_7 为
 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ ； Q 为 $\text{CH}-R_8$ ； R_8 为 $=\text{N}-\text{NHC}(=\text{O})-\text{NH}_2$ 、 $=\text{N}-\text{OH}$ 、 $=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、
 或 $=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$ 。

25 本文所用的术语“烷基”，包括直链、支链和环状烃基如乙基、异
 丙基和环戊烷基。取代的烷基是其中的一个或多个氢原子被卤素、其它
 烃基(例如，苯基)、杂芳基、或一个或多个碳原子被氧原子打断的基团
 所置换的烷基。优选的烷基具有 1 至约 8 个碳原子。本文所用的术语“
 卤素”具有其通常的涵义，包括氟、氯、溴和碘，其中氟是优选的卤素。
 本发明所用的术语符号“Arg”具有其正常的涵义，它是精氨酸的缩写符
 30 号。

35 本发明的一些实施方案的化合物包含保护基团。本发明所用的术语
 “保护基团”具有广泛的意义。人们知道保护基团本身是指可选择性地
 附着到被保护的官能基团(如羟基、氨基和羧基)上并可从其上移去的化
 学官能团。这些基团存在于化合物中，使所述的被保护的官能基团在该
 化合物所暴露的化学反应条件下是惰性的。各种各样的保护基团均可用

于本发明。一个这样的保护基团是苯二甲酰亚氨基。根据本发明，其它优选的保护基团具有下列通式：



15 可在 Green, T.W. 和 Wuts, P.G.M., "Protective Groups in Organic Synthesis" (第二版, Wiley & Son 出版, 1991)中找到适用于本发明实际操作更具代表性的保护基团,将该文献所公开的全部内容引入本文作参考。

20 正如以前所指出的, MCP 活性与各种紊乱和疾病有关。因为本文所公开的化合物可用于抑制 MCP 的活性, 以及因为该化合物可用于研究和治疗应用, 因此通过使 MCP 与本发明的化合物接触来抑制 MCP 活性的方法包括将该化合物作为药物或药剂供给包括人在内的哺乳动物。

25 本文所用的术语"接触"是指将要接触的部分直接或间接地放在一起, 以使所述要接触的部分彼此物理接触。因此接触包括物理行为如将所述要接触的部分一起置于容器中, 或用所要接触的部分对患者给药。因此, 例如, 对表现患有与 MCP 活性异常相关疾病或紊乱(MCP 与这些疾病或紊乱有关)的病人施用本发明的化合物, 即在术语"接触"所定义的范围内。

30

在优选的实施方案中, 对患有与 MCP 异常相关的紊乱(即异常身体状态)、疾病或病理生理状态的患者施用根据本发明的药物组合物。被施用本发明组合物的紊乱优选是那些直接或间接地产生肌肉物质消耗(即损失)的紊乱, 也就是肌肉消耗性疾病。这些紊乱包括肌肉营养不良、

35

心性恶病质、肺气肿、麻风病、营养不良、骨软化、幼儿急性白血病、AIDS 恶病质和癌恶病质。

5 在本发明的上下文中，“施用药物”意味着将药物组合物引入患者体内。优选的施用药物的方法包括静脉内、皮下和肌肉内给药。优选以药物组合物的形式施用该化合物，所述药物组合物含有该化合物和药物学上可接受的载体如生理盐水。其它适当的载体可在 Remington's Pharmaceutical Sciences (药物科学), (Mark Pub. Co., Easton, PA, 1980) 中找到。

10

本文所述的化合物在药物组合物中的浓度的变化取决于许多因素，所述因素包括药物施给的剂量、所用的化合物的性质(即疏水性)和给药的途径。总的说来，可使生理缓冲水溶液中含有约 0.1-10%(重量/体积)的本发明的化合物，以用于肠胃外给药。通常的剂量范围是约 1 ug-1 g/kg 体重/天；优选的剂量范围是约 0.01 mg-100 mg/kg 体重/天。优选的给药剂量可能依赖于下列可变因素：疾病发展的类型和程度、特定患者的整体健康状况、所选化合物的相对生物学效能、化合物赋形剂的配方和药物的给药途径。本文所用的术语“患者”是指任何类型的脊椎动物。优选的患者是人。

20

肌营养不良是遗传病，其特征是肌肉纤维的进行性无力和变性，而没有神经退化的征象。患杜兴氏肌营养不良(DMD)的患者显示肌肉物质平均减少 67%；在肌强直营养不良的患者中显示部分肌肉蛋白质的合成平均下降了 28%，而没有任何非肌肉蛋白质合成的相应降低(可能是由于终末器对同化激素或底物的应答受损害)。已表明在 DMD 患者的肌肉中有被加速的蛋白质分解。

30

严重的充血性心力衰竭(CHF)的特征是心性恶病质，即，心肌和骨骼肌均发生肌肉蛋白质消耗，并伴有平均 19%的体重减轻。心性恶病质是由肌原纤维蛋白降解速率的增加引起的。

35

肺气肿是慢性阻塞性肺病，其定义为远离终末非呼吸性细支气管的气体空腔扩大，并伴有肺泡壁的破坏性变化。肺功能降低的临床表现是咳嗽、喘鸣、反复呼吸系统感染、水肿和功能性损害以及寿命缩短。在肺气肿患者中，酪氨酸的流出增加了 47%。而且，全身的亮氨酸流保持正常，全身的亮氨酸氧化增加，全身的蛋白质合成却降低。结果是肌肉

蛋白质合成减少，并伴随全身蛋白质更新和骨骼肌物质的减少。该减少随着病情的发展和长期的恶化变得日益明显。

5 在糖尿病中，有手小肌肉的一般性消耗，这是由于慢性部分去神经(神经病)引起的。这在长期疾病的发展过程中变得最为明显，且病情更加严重。

麻风病与发生在拇指和食指的掌骨间的肌肉消耗有关。严重的营养不良的特征是，尤其是严重的肌肉消耗。

10

骨软化是由维生素 D 和钙缺乏引起的营养性紊乱。它在儿童中被称为“佝偻病”，在成人中被称为骨软化。它的标志是骨头变软(由于矿化作用受损害、并有类骨质的过量积累)、疼痛、触痛、肌肉消耗和无功、厌食和总体重减轻。该病可由营养不良、反复怀孕和哺乳(消耗贮备的维生素 D 和钙或使之耗尽)和维生素 D 抗性引起。

15

在幼儿急性白血病中，有蛋白质能量营养不良，该营养不良导致骨骼肌消耗。已有研究表明，某些儿童甚至在诊断出白血病之前就表现出肌肉消耗，其肌肉物质平均减少了 27%。同时也有 33-37%的脂肪组织增多，从而导致相对体重和四肢周缘没有变化。

20

癌性恶病质是一种复杂的综合症，它发生在各种患有肿瘤和血液学恶性病的患者中。在临床上，癌性恶病质表现为体重减轻、脂肪组织和无脂肪肌肉组织的大量消耗，而且该病是由癌所导致的死亡的一个原因。癌性恶病质患者存活时间较短，对化疗的反应减弱。除了由肌肉消耗引起的紊乱之外，看来另一些情况和条件也以某种方式与肌肉物质的减少相关。所述情况和条件包括由慢性背疼引起的肌肉消耗、年纪过大、因生病或受伤而长期住院、酗酒和皮质类固醇疗法。

25

30 已有研究表明，在慢性下背疼痛严重的病例中有脊柱旁(paraspinal)肌肉消耗。脊柱旁肌肉消耗的减少可解除疼痛并使功能改善。

35

人们还认为老年人的总体虚弱是由肌肉消耗引起。在老化过程中，骨骼肌逐渐被纤维组织代替。结果是肌肉力量显著下降，但无脂肪物质仅边缘减小。

已有研究表明，在遭受外伤或患慢性病以及长期住院的患者中，存在长期持续性的单侧肌肉消耗，肌肉物质平均减少了31%。研究还表明，这可通过加强生理治疗而得到纠正。然而，对于多数的患者而言，用药物治疗来实现改善能更有效。

5

在酗酒者中，存在前胫骨肌肉的消耗。这近似于肌肉损害，该损害是由神经原性损害引起的，也就是说，由糖酵解和磷酸酶的酶活性受损引起的。酒精滥用持续时间越长，损害变得明显和加剧。用经皮质类固醇治疗的患者表现出肌肉物质的损失。

10

已经表明 MCP 可活化炎症的细胞内介质，被称作 $\text{NF}_{\text{kappa}}\text{B}$ 。参见 Baeuerle, P.A. 和 Henkel, T. (1994) *Annu. Rev. Immunol.* (免疫学回顾年刊), 12, 141-179。因此，MCP 抑制剂可能具有可用来治疗自身免疫和炎症疾病的用途。

15

可用本发明的化合物来减轻由前述情形以及其它情形引起的肌肉物质损失。另外，本发明的 MCP 抑制剂可用在兽医和动物饲养应用方面，以抵御动物的体重减轻，或促进生长。

20

MCP 参与经由 I 类主要组织相容性复合体 (MHC I) 途径的肽抗原呈递。参见 (Goldberg 和 Rock, 期卷同上文; 还参见 Rock 等, *Cell* (细胞), 78:761-771 (1994) (下文称之为“Rock 等”)。因此，MCP 抑制剂可用作研究试剂，在所述研究中 MHC I 途径的抑制是人们所希望的; 以及用于减轻与异常 MHC-I 抗原加工有关的疾病和紊乱。因为大多数被呈递到 MHC-I 分子上的肽的精确来源至今还不清楚，并且因为最近积累了一些证据，这些证据说明 MCP 可能在 MHC-I 呈递作用中起作用 (参见 Rock 等, 期卷同上文)，所以本文公开的阻断 MHC-I 呈递中抗原的蛋白水解加工的 MCP 抑制剂将在解析该途径的重要性方面发挥作用。

25

30

令人惊奇地发现已经发现本发明的 MCP 抑制剂了可用以增强 Cu/Zn 过氧化物歧化酶-1 (“SOD-1”) 酶的活性。因此，可将这些化合物用于研究领域以研究 SOD-1 缺乏体系，以及用于治疗特征在于 SOD-1 酶活性减低的神经退化性或其它疾病 (即其中所述的减低可能是紊乱的发病机理)。这些情况包括涉及氧化性应激的疾病如帕金森氏病、阿耳茨海默氏病、杭廷顿氏舞蹈病、中风 (stroke)、创伤和局部缺血。

35

SOD-1 是同型二聚体含金属酶, 该酶催化有毒性的过氧化物阴离子 O_2^- 歧化变成 O_2 和 H_2O_2 。SOD-1 是自由基的清道夫, 因此它是过氧化物自由基去毒作用的第一道防线, 所述过氧化物自由基是需氧代谢的正常副产物。最初发现 SOD-1 存在于真核生物中, 而且在所有类型的细胞的细胞质中均发现了它。SOD-1 是生理应答氧毒性的必需的酶, 并已被作为与氧化性应激有关的病理状态的治疗剂加以研究。参见 Bannister 等, *CRC Crit. Rev. Biochem.*22: 111-180(1987); Halliwell 等, *Methods in Enzymol.*(酶学方法), 186: 1-75(1990); Greenwald, *Free Rad. Biol. Med.*(自由基生物学)8: 201-209(1990)。

阻碍 SOD-1 用作治疗剂的特征是当它被外源供给时很难进入细胞内, 以及它在血清中的半衰期极短。因此, 增强细胞内的 SOD-1 活性的化合物将使 SOD-1 治疗有显著的进步。

ALS 是由脊髓和脑的大运动神经元变性引起的进行性麻痹性紊乱。大约 5-10% 的 ALS 病例是家族性的(FALS), 且以常染色体显性方式遗传。最近, 在一些患有 FALS 的家族中已鉴定出 16 个不同的错义突变, 且这些突变发生在编码 SOD-1 的基因内。参见 kosen,D.R.等, *Science*(科学)261: 1047-1051(1993); Deng,H.-X.,等, *Nature*(自然)362: 59-62(1993)。这些突变导致 SOD-1 活性在红细胞和脑组织中减低, 并且已经表明这些突变使 SOD-1 蛋白质失去稳定, 从而导致酶更新增加。参见 Bowling,A.C.,等, *J. Neurochem.*(神经化学期刊)61: 2322-2325(1993); Borchelt,D.R.,等, *Proc. Natl. Acad. Sci*(国家科学院进展)91: 8292-8296(1994)。因此, 对基于 SOD-1 和 ALS 关系的 ALS 转基因小鼠模型已有描述。Brown,R.H. 331/16 *NEJM* 1901(1994)。

我们已经发现, 我们的 MCP 抑制剂是 SOD-1 的强有力的阳性效应物。优选的 MCP 抑制剂(本文称之为化合物 14)以剂量依赖的方式特异地使野生型和突变型 SOD-1 的降解减少。化合物编号基于实施例的编号, 所述实施例公开了该化合物的合成, 例如化合物 14 的合成列于实施例 14, 见下文。正如本文所用的, SOD-1 降解的减少是指 SOD-1 蛋白质分解代谢的速率受到阻抑。

以下面实施例的方式对本发明做进一步的阐述。这些实施例是对本发明的进一步说明, 而不是对所附权利要求范围的限制。

实施例 1：从人体组织中分离多相催化蛋白酶

用自尸体中得到的人肝和脑样品，通过离子交换层析、硫酸铵沉淀、以及凝胶过滤来分离和部分纯化 MCP(例如， Driscoll 和 Goldberg, Proc. Natl. Acad. Sci(国家科学院进展)86, 787-791(1989); Yamamoto 等, Biochim, Biophys. Acta 882, 297-304(1986))。对于每种原料，用 10 倍体积的含 20%甘油的 20mM Tris-HCl (pH 7.5)匀浆。在 40, 000 × g 离心 30 分钟后，测定上清液中的 MCP 的胰凝乳蛋白酶样组分的蛋白水解活性(参见下文)。将上清液在 DEAE-Sepharose Fast Flow(DEAE-琼脂糖快速流式)柱上分级分离，所述柱子是以匀化的缓冲液平衡过的。每升上清液用 250ml 的树脂。上样后，柱子用 10 体积的匀化缓冲液洗涤，而蛋白质用自 0-400mM 线性梯度的 NaCl 洗脱(对于 250ml 树脂需 2 升的洗脱液)。测定级分的 MCP 活性，合并有活性的级分并以 80%饱和的 (NH₄)₂SO₄ 沉淀之。离心收集沉淀出的蛋白质，将之重新悬浮于匀化的缓冲液中，并上样到已用牛血清白蛋白(68 kDa)标准化过的 Sephacryl S300HR 柱(500ml)树脂体积)中。洗脱出分子量为约 650kDa 的 MCP 活性的单个峰。该制备物无其它可测出的蛋白水解活性，而且在 4 °C 下贮存 6 个月以上仍能维持其 MCP 活性。将该制备物用于大多数的实验。将该制备物在羟基磷灰石-Ultrogel 柱(Yamamoto 等, 期卷号同上)上进一步分级分离，得到更纯的酶，根据变性的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，该酶由 M₁ 在 20-35kDa 间 10 个以上的亚单位构成。

实施例 2：MCP 的胰凝乳蛋白酶样和凝蛋白酶样活性的检测

上文所述的 MPC 的分离步骤产生酶复合体，该复合体的蛋白水解活性是潜在的，但它可通过加入低浓度(0.02-0.05%)的 SDS 而被活化(Yamamoto 等, 期卷号同上文)。胰凝乳蛋白酶样活性的检测采取下列步骤：在 96 孔的微滴定板上，用含 0.04%SDS 的匀化缓冲液将人 MCP 稀释 4-10 倍。加入从 Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, Pennsylvania 购得的比色底物 MeOSuc-EVKM-对-硝基-N-酰苯胺(甲氧基琥珀酰基-Glu-Val-Lys-Met-对-硝基-N-酰苯胺)，至其终浓度为 100 μ M，所述比色底物来自其浓度为 10mM、溶剂为二甲亚砷的贮备溶液。反应体积为每孔 200 μ l。在 37 °C 温育不同的时间后，游离的对-硝基苯胺的浓度用 Biotech EL-340 微板读数器测定，读取其在 490nm 的光吸收值。在底物的水解随时间而线性增加以及吸光度的变化与游离对硝基苯胺的浓度成比例的情况下，测定蛋白酶的活性。或者，使用产荧光的底物甲氧

基琥珀酰基-Phe-Leu-Phe-氨基甲基香豆素(Enzyme Systems Products,Dublin,CA),并在 390nm 激发、460nm 发光的条件下监测荧光的变化。

5 按上文所述并加以下列改进,检测人 MCP 的胰蛋白酶样活性。在补加了 1mM 的 2-巯基乙醇的 Tris-甘油缓冲液(pH 9.5)中进行反应,底物是发荧光底物苜氧基羰基-Phe-Arg-AMC (100 μ M)。

10 在 37 $^{\circ}$ C 温育不同的时间后,用带有 390nm 激发滤器和 460nm 发光滤器的 Fluoroskan II 分光荧光计测定游离 AMC 的浓度。在底物的水解随时间而线性增加以及荧光度的变化与游离 AMC 的浓度成比例的情况下,测定蛋白酶的活性。

15 实施例 3: MCP 抑制剂的 IC₅₀ 值的测定

IC₅₀ 值通常定义为产生 50%的酶活性抑制时所需的化合物的浓度(在本申请中,所述化合物指的是本文公开的 MCP 抑制剂)。IC₅₀ 值对于化合物的指定用途而言是表征该化合物活性的有用指标。本发明的抑制剂优选具有小于约 10 μ M 的 IC₅₀ 值。

20 在加入底物之前,通过使酶与各种浓度的推测抑制剂于 37 $^{\circ}$ C 温育 15 分钟,来测定 MCP 的胰凝乳蛋白酶样或胰蛋白酶样活性的抑制。每种试验条件的估测重复三次,对于本文公开的抑制剂均进行重复试验。

25 实施例 4: 抑制细胞肌肉降解的证明: 幼年大鼠的不受重(unweighting)萎缩的抑制

测定了几种抑制剂对幼年大鼠的比目鱼肌的不受重萎缩的作用效果。关于该过程的总体讨论请参见 Tischler,M.E.(1990) Metabolism(代谢作用)39/7: 756-763(下文称该文献为“Tischler-1990”)。

35 如 Jaspers,S.R.和 Tischler,M.E.,(1984) J. Appl. Physiol.(应用生理学期刊)57: 1472-1479 中所述,将幼年雌性 Sprague-Dawley 大鼠(80-90g)的尾巴除去,将其后肢悬起。使动物的后肢高于笼子的底面,每只动物占一个笼子。动物可以自由采食食物和水,在后肢被悬吊起时和终止时对动物称重。在悬吊期间,每天对动物进行检查,以保证其脚趾不触及

笼子的底面，并保证尾巴不因被去除而有任何肿胀。

A、试验设计--第1部分

5 各试验以悬吊起 20 只大鼠开始，将这 20 只大鼠随机地分成 4 组，
每组 5 只。对 A 组仅悬吊 2 天，用之提供基线数据，以比较悬吊较长时
10 间的其它动物的比目鱼肌的大小。在研究开始时，比较各组的平均体
重，并用作身体大小差异的校正因子。B 组是第二对照组，在未受重 2
天后，一条后肢的比目鱼肌用汞撒利的水溶液处理，以示在未受重期间
15 减慢肌肉萎缩的能力。以前已有人研究过汞撒利，并被证明它在基本上
如本文所述的体内模型中可防止萎缩。参见 Trischler-1990。在不受重
开始后的第 2 天，将汞撒利的水溶液(200nM;4 μ l/100g 起始体重)注射
到一条肢的比目鱼肌中(如前文所述)。对侧肢的肌肉注射类似体积的
0.9%的盐水(“载体”)。在原位注射步骤期间，用 Innovar-vet(10 μ l/100g
20 体重)使动物保持安静。注射后，将动物再悬吊 24 小时，并取出比目鱼
肌。各试验的 C 组和 D 组用于试验两个不同的本文公开的化合物的实施
方案。除了将溶于二甲亚砜中的 1mM 的 MCP 抑制剂注射到一条腿的比
目鱼肌中而仅将 DMSO 注射到对侧的比目鱼肌中外，如 B 组一样对动
物进行处理。因此，每个试验由 2 个对照组和测验本发明 MCP 抑制剂的
25 试验组组成。用不同组对的抑制剂完成 5 个这样的试验，提供了 n 值
为 10 的各 MCP 抑制剂的试验，各 MCP 抑制剂均用 2 批不同的动物进
行式。

B、比目鱼肌的处理--第1部分

25 将动物处死后，切取比目鱼肌，剔掉脂肪和结缔组织，并仔细称重。
然后，将该肌肉在 10%的三氯乙酸(TCA)中匀浆化，离心沉淀沉淀出蛋
白质。然后用 10%的 TCA 洗涤沉淀物一次，并用 1: 1 的乙醇: 乙醚
30 洗涤一次。将最终的沉淀物溶解于 4ml 1N 的 NaOH 中。然后以白蛋白
作标准物，以双缩脲法分析样品的蛋白质含量。

C、数据分析--第1部分

35 通过与未处理的对侧肌肉配对地比较，初步检查 MCP 抑制剂对总
肌肉蛋白质含量的作用效果。计算含量的比值，然后通过方差分析
(“ANOVA”)进行统计分析。左腿通常是处理过的腿，以便蛋白质的

含量比值可与未被处理的对照动物做比较。这样，通过比较两条腿的蛋白质含量以及受试 MCP 抑制剂的相对有效性就可显示出显著差异。为评价各个独立处理的效果还进行了配对 t 检验。也可用未处理对照的数据来估计第 2 天的蛋白质含量。这使 B、C 和 D 各组在处理 24 小时后的蛋白质变化得以近似估计。

D、试验设计--第 2 部分

每个试验由 10 只动物组成，每种抑制剂用 5 只动物测试，测试其对蛋白质合成的抑制作用。该研究的这方面不需要对照动物，因为可用对侧 DMSO 处理的肌肉作为抑制剂处理的肌肉的相应对照。如同第 1 部分中的 C 组和 D 组所描述的一样，对各组进行注射。原位处理 24 小时后，对两块比目鱼肌的蛋白质合成的分数速率进行分析。对各肌肉注射含 ^3H -苯丙氨酸(50mM; $1 \mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)的 0.9%盐水溶液($3.5 \mu\text{l}/100\text{g}$ 最终体重)。15 分钟后，将占肌肉三分之二的中段切出，并对肌肉按下文所述进行处理。

E、比目鱼肌的处理--第 2 部分

首先将肌肉在含 0.5mM 放线菌酮(以终止蛋白质的合成)和 20mM 环亮氨酸(cycloleucine)(以俘获细胞内的苯丙氨酸)的 0.84%盐水内洗涤 10 分钟。然后将肌肉在 2.5ml 2%的冰冷高氯酸中匀浆化。离心使沉淀出的蛋白质成团。取一等分的上清液进行液闪计数，使另一等分的上清液进行苯丙氨酸到苯乙胺的转化，以荧光法测定可溶苯丙氨酸的浓度。参见 Garlick, P.J. 等, *Biochem. J.*(生化期刊), 192 719-723(1980)和 Munoz, K.M. 等, 1993 *Meatbolism*(代谢), 付印中。这些数值提供了细胞内的特异活性。通过在 6N HCl 中加热使蛋白质水解后，测定苯丙氨酸在肌肉蛋白质中的特异活性。将释放出的氨基酸溶解在缓冲液中。取一等分进行闪烁计数，另一等分用于上清液部分的苯丙氨酸分析。如下计算蛋白质合成的分数速率：蛋白质的特异活性/细胞内的特异活性 × 时间。

F、数据分析--第 2 部分

在配对的基础上对各 MCP 抑制剂进行蛋白质合成分析。以配对 t 检验比较对侧肌肉，确定抑制剂对蛋白质的合成是否有任何作用效果。

蛋白质的降解被近似地计算为蛋白质合成的分数率(来自第 2 部分)加上蛋白质增加的分数率(来自第 1 部分), 其中蛋白质损失使蛋白质增加的值变成负数。

- 5 MCP 抑制剂定性地减缓蛋白质损失而不影响蛋白质合成的能力表明蛋白质降解的减缓。

G、结果

- 10 表 1 表示 MCP 抑制剂对对照肌肉缺乏作用。

表 2 表示在未受重的第 3 天内的蛋白质含量的变化。

表 3 表示 MCP 抑制剂对未受重肌肉蛋白质的作用效果。

15

表 4 表示 MCP 抑制剂对未受重肌肉合成的作用效果。

在这些表中, 化合物的号码指的是实例的编号, 在所述实例中列出了该化合物的合成途径。

20

表 1

MCP 抑制剂对对照肌肉缺乏作用

处 理	蛋白质(mg/肌肉)	
	载 体	处 理
DMSO	5.9	6.7
化合物 34	6.1	6.3
化合物 14	6.0	6.1
化合物 20	5.7	5.9

25

表 2

在未受重的第 3 天蛋白质含量的变化

处理	蛋白质(mg/肌肉)		效果 (%)	P
	开始	结果		

盐水	6.5	5.7	-12	<0.001
DMSO	6.5	5.9	-10	<0.001
汞撒利	6.4	6.6	+3	<0.05
化合物 34	6.3	6.6	+5	<0.05
化合物 14	6.8	6.4	0	>0.1
化合物 20	6.5	6.2	-4	<0.07*
化合物 16	6.3	6.0	-5	<0.07*

*显著值

表 3

MCP 抑制剂对未受重肌肉蛋白质的作用效果

处理	蛋白质(mg/肌肉)		效果 (%)	P
	载体	处理		
汞撒利	5.7	6.6	14	<0.001
化合物 34	5.9	6.6	12	<0.001
化合物 14	6.0	6.4	7	<0.06*
化合物 20	5.9	6.2	5	<0.05
化合物 16	5.9	6.0	0	>0.1

5

*显著值

表 4

MCP 抑制剂对未受重肌肉的合成缺乏作用

处理	蛋白质(mg/肌肉)	
	载体	MCP 抑制剂
化合物 34	14.5	13.3
化合物 14	13.1	13.8
化合物 20	14.1	14.6

10

实施例 5 用 MHC-1 加工显示 MCP 抑制

15

测试本发明化合物抑制 I 类主要组织相容性途径(MHC-1)加工外源 OVA 抗原的能力。将 MCP 抑制剂用于功能性抗原加工系统(该系统使抑制剂在抗原加工细胞接触抗原期间被包裹在细胞内), 然后固定加工细胞。在不存在抑制剂的情况下, 向加工细胞中加入 T 细胞杂交瘤, 以确定肽-MHC-I 复合体的表达, 该复合体的表达反映在固定前的抗原加工

上。

A. 细胞培养

5 将细胞于 37°C 在维持 5% CO₂ 的湿化环境下培养于标准培养基中，该标准培养基为含 10% 胎牛血清(Hyclone, Logan UT)、 5×10^{-5} M 2-巯基乙醇、抗生素和下列添加剂：L-精氨酸 HCl (116mg/L)、L-天冬氨酸(36mg/L)、NaHCO₃(2g/L)、丙酮酸钠(1mM)的 DMEM(Gibco, St. Louis, MO)。请再次参见 Harding, C.V., (1992) Eur. J. Immunol. (欧洲免疫学杂志)
10 22: 1865-1869。用 M12.B6 细胞(由 Osami Kanagawa, Washington University, ST. Louis, MO 慷慨馈赠)进行抗原的呈递；它们是通过将 M12.C3 鼠源 B 淋巴瘤细胞和 LPS 刺激的来源于 C57BL/6 小鼠的脾细胞(B 淋巴母细胞的来源)融合而制得的。因此，它们表达 H-2^b 抗原。DOBW T 杂交瘤对于结合了 I-A^b 或 I-A^d 的 OVA(323-339)肽具有特异性。参见
15 Yewdell 等, Science(科学)1988 239: 637。B3.1 T 杂交瘤细胞对 OVA(258-276)-K^b 产生应答。

B. 电穿孔和抗原加工研究

20 为了被 MHC-1 途径加工和呈递，外源抗原(卵清蛋白, OVA)必须渗入到加工细胞的胞液中。通过电穿孔方式将 OVA 引入到加工细胞(M12.B6)的胞液中。

用具有 0.4cm 窄缝杯室的 Gibco BEL 电穿孔器进行电穿孔。电容为
25 800 μ F, 电压为 50-300V。于 4°C 在 OVA 存在下，在不含血清的 RPMI 或 PMEM(Gibco)中对 1.5×10^7 M 12.B6 细胞/ml(0.5×10^7 - 4.0×10^7 的范围)进行电穿孔。将细胞立即置于冰上。然后加入各种抑制剂，并将细胞移至 18°C 或 37°C。最后用 1% 的多聚甲醛将细胞轻轻固定约 10 分钟，并于 37°C 充分洗涤，防止进一步的加工。以 M12.B6 细胞刺激 B3.1 或
30 DOBW T 杂交瘤细胞分泌 IL-2 的能力来确定加工的程度(即，特异性的肽-MHC 复合体表达的水平)。用 0.2ml 的 M12.B6 细胞(如果固定过， 2×10^5 个细胞；如果为活细胞， 5×10^4 个细胞)于 37°C 在 10² 室内对 T 细胞(10^5)铺板 18-24 小时。两种 T 杂交瘤均对抗原的刺激产生应答，分泌 IL-2(通过 IL-2-依赖性 CTLL 细胞增殖和 [³H]胸腺嘧啶的掺入来测定上
35 清液中的 IL-2，参见 Allen 等, J. Immunol(免疫学杂志)132: 1077)。

这些研究的结果示于图 1-3。图 1 显示化合物 14 和 16 对 M12.B6 细胞加工电穿孔的 OVA 的作用效果。图 2 和图 3 显示化合物 14 和 20 对 MHC-1 OVA 加工的作用效果。两种化合物均能有效地抑 OVA 的加工。这些资料为本发明化合物的 MCP 抑制性作用提供了额外的支持。人们接受了经典的 MHC-1 途径涉及蛋白酶体对抗原的降解。参见 Goldberg 等，期卷号同上文。因此，这些化合物可用于抗原水解加工重要性的进一步研究。

实施例 6

A. Cn/Zn 过氧化物歧化酶(SOD-1)降解的减少

I. 第 1 部分--克隆和诱变

小鼠 SOD-1 cDNA 克隆来自 Jim Mahaffey (North Carolina State University, Raleigh, NC)。用聚合酶链式反应(PCR)方法对该克隆进行修饰,以便 1)在紧接 ATG 起始密码子的上游引入 Kozak 转译起始共同信号(即,5' -GCCGCCACC-3'), 2)引入该共同信号至 5' 端的 Hind III 限制位点, 3)在此 cDNA 的 3' 末端引入 XhoI 限制位点。用于 PCR 步骤的寡聚核苷酸引物是:5' 引物(EH87)=5' -TCG ATCGAAGCTTGCCGC CACCATGGCGATGAAAGC-3' (SEQ ID NO:1), 3' 引物(EH88)=5' -AG CTAGCCTCGAGCAGATTACAGTTTAATG-3' (SEQ ID NO:2)。将所得的 PCR 产物用限制酶 Hind III 和 Xho I 消化,并将之克隆到 Hind III +Xho I 消化过的载体 pBluescript II SK+(Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA)中,得到 pSK-HX2。

用 Ho 等在 Gene(基因)77:51-59(1989)中描述的重叠延伸 PCR 诱变步骤,将第 4 位氨基酸(Ala⁴ → Val)(GCG--GTG)和第 113 位氨基酸(Ile¹³ → Thr)的 FALS 点突变引入 SOD-1 cDNA 克隆 pSK-HX2 中。Ile¹³ → Thr 的突变体的构建如下:用 5' 引物 EH78 和 3' 引物 EH84 来产生 5' PCR 片段;其中 EH78 的核苷酸序列为 5' -TTAATCCTCACTCTAAGAAAC-3' (SEQ ID NO:3)(SOD-1 cDNA 的第 193 至 213 位的核苷酸,其中的#1 是 ATG 起始密码子中的 A), EH84 的核苷酸序列为 5' -TTGTACGGC CAGTGATGGAATGCT-3' (SEQ ID NO:4)(第 351-328 位的核苷酸)。用 5' 引物 EH83 和 3' 引物 EH42 来构建 3' PCR 片段;其中 EH83 的核苷酸序列为 5' -AGCATTCCATCACTGGCCGTACAA-3' (SEQ ID NO:5)(第 328-351 位的核苷酸), EH42 的核苷酸序列为 5' -TAATACG ACTCACTATAGGG-3' (SEQ ID NO:6) (pBluescript II SK+的第 625 至

645 位的核苷酸)。在第二步的 PCR 反应中将 50ng 的 5' 和 3' PCR 片段结合起来,并用引物 EH78 和 EH42 扩增。用 Bal I 和 Xho I 消化该 PCR 产物,并克隆到已被 Bal I +Xho I 消化过的 pSK-HX2 中。由此,天然的 255bp 的 Bal I/Xho I 片段被 FALS 突变片段所置换(克隆 pSK-113)。

Ala⁴ → Val 的突变的构建如下:用 5' 引物 EH105 和 3' 引物 EH41 产生 5' PCR 片段;其中 EH105 的核苷酸序列为 5' -GCACACCACTTT CATCGCCATGGTGGCGGCAAGCTTCGATC-3' (SEQ ID NO:7)(第+21 至-20 位的核苷酸), EH41 的核苷酸序列为 5' -ATTAACCCTCACTAA AGGGA-3' (SEQ ID NO:8) (pBluescript II SK+ 的第 792 至 773 位的核苷酸)。用 5' 引物 EH104 和 3' 引物 EH103 来产生 3' PCR 片段;其中 EH104 的核苷酸序列为 5' GATCGAAGCTTGCCGCCACCATGGC GATGAAAGTGGTGTGC-3' (SEQ ID NO:9)(第-20 至+21 位的核苷酸), EH103 的核苷酸序列为 5' -CTTCAGTTAATCCTGTAA-3' (SEQ ID NO:10)(第 123 至 106 位的核苷酸)。如上文所述,在第二步的 PCR 反应中,将 50ng 的 5' 和 3' PCR 片段结合起来,并用引物 EH41 和 EH103 扩增。用 Hind III 和 Rsr II 消化该 PCR 产物,将之克隆到 Hind III +Rsr II 消化过的 PSK-HX2 中,由此,天然的 51bp 的 Hind III/Rsr II 片段被 FALS 突变片段所置换(克隆 PSK-A4V)。用 Sequenase 方法(US Biochemical, Cleveland,OH)对上文所述的所有 PCR 产物进行测序,以证实突变的存在并且没有任何的 PCR 错误。对 SOD-1 基因的描述被示于图 4,图中显示了突变、引物和限制性位点的位置。

通过用 Hind III 和 Xho I 消化野生型(PSK-HX2)和突变构建体 (pSK-113 和 pSK-AV4)来构建 SOD-1 cDNA 表达载体。将含有 SOD-1 cDNA 序列的所得的 546bp 的三个片段分别克隆到 Hind III+Xho I 消化的 pcDNA I/Neo(Invitrogen Corp., San Diego, CA)中,以分别产生 pCMV-HX5(野生型 SOD)、pCMV-113(Ile¹¹³ → Thr)、和 pCMV-A4V(Ala⁴ → Val)。

II、第 2 部分

进行初始的试验以确定 FALS 突变的 SOD-1 蛋白质的稳定性减低是否是由 MCP 介导的蛋白水解降解引起的。被定名为 293 的人肾细胞系(人 293 细胞或 293 细胞)得自于美国典型培养物保藏中心(ATCC)

12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852(ATCC# CRL 1573), 并将之培养于 Dulbeccos 改良的 Eagle 氏培养基中, 该培养基中含有 4.6g/L 葡萄糖、10%热天活的马血清(Gibco/Life Technologies Inc. Gaithersbury, MD). 使人 293 细胞于 37 °C 维持在 5%的 CO₂ 气中。用磷酸钙方法(Chen, C.等,Biotechniques 6:632(1988)), 瞬间转染该 293 细胞。将 pCMV-113 SOD-1 表达载体引入 239 细胞, 24 小时后, 将该细胞分别与浓度为 5 μM 的化合物 34、化合物 14 或者化合物 24 一起温育 24 小时。将已知的 MCP 或其它蛋白酶的抑制性化合物溶解于二甲亚砜(DMSO)中。其它的 293 细胞培养物与特体积的 DMSO 一起温育, 或将之留在培养基中仅作为阴性对照之用。

在接受试验化合物约 48 小时前, 将 5×10^5 个 293 细胞接种于 36mm 培养皿中, 并在 37 °C 5%的 CO₂ 气中维持。细胞与 MCP 抑制剂(化合物 34、14 或 24)或者与作为阴性对照的 DMSO 一起温育 24 小时。通过冻融循环, 在约 75 μl 的磷酸盐缓冲液(PBS)中裂解细胞, 来制备细胞溶胞产物。用 BCA 方法(Pierce, Rockford, IL)测定细胞溶胞产物中的蛋白质浓度; 用 Tris/甘氨酸/SDS(25mM Tris/192mM 甘氨酸/0.1%SDS)缓冲系统, 在 4--20%的聚丙烯酰胺凝胶(Novex, San Diego, CA)上对 2--2.5 μg 的各样品进行电泳。以电洗脱将蛋白质转移到硝酸纤维素滤膜上, 通过在布劳托(blotto)溶液(溶于 25mM Tris 缓冲盐水(1xTBS)的 5%干牛奶)中温育 30 分钟而使滤膜封闭。将滤膜转移到第一抗体溶液(在布劳托溶液中作 1:10,000 的稀释), 并温育 2--18 小时。这些研究所用的第一抗体为抗由 E. Coli 产生的纯化的小鼠 SOD-1 的多克隆兔抗血清(Hazelton Research Products, Denver, PA)。用 1 × TBS 将滤膜洗 3 次, 每次 5 分钟, 并使滤膜在第二抗体溶液(在布劳托溶液中作 1:2,000 的稀释)中温育 2 小时。所述的第二抗体是与碱性磷酸酶(Bio-Rad, Richmond, CA)相连的羊抗兔 IgG。用 1 × TBS 将滤膜洗 3 次, 每次 5 分钟, 并将滤膜在市售购得的碱性磷酸酶检测试剂(Bio-Rad, Richmond, CA)中温育 5-60 分钟, 染色显示碱性磷酸酶的活性。用 DocuGel V 图像分析系统和 RFLPscan 软件(Scanalytics, Billerica, MA)定量分析对应于 SOD-1 蛋白质的染色带。SOD-1 的量以相对于阴性对照的感应单位(即, 测试出的单位数除以对照的单位数)表示。细胞溶胞产物的免疫印迹分析显示: 与 MCP 抑制剂一起温育的 3 个样品的 SOD-1 水平与对照的 SOD-1 水平相比都有一定程度的提高(图 5)。这些结果表明 MCP 被本发明的化合物抑制导致 SOD-1 蛋白质在 Ile¹¹³ → Thr 突变体中的积累增多, 因而暗示着 MCP 引起 SOD-1 在含有 FALS 突变的细胞中的含量减少。

III、第3部分

为进一步显示 MCP 活性与 SOD-1 的含量有直接关系,用稳定地产生野生型小鼠 SOD-1 或 FALS 突变蛋白质(即,Val 取代了 Ala⁴以及 Thr 取代了 Ile¹¹³)的细胞进行了研究。以 SOD-1 cDNA 表达构建体(上文所述)通过磷酸钙转染(Chen, C.等, *Biotechniques* 6:632(1988))法转染 293 细胞,接下来使细胞生长于含 1mg/ml G418(GeneticinTM, Gibco/Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD)的培养基中选择新霉素抗性,来产生上文所提到的表达小鼠天然 SOD-1 和两个 FALS 突变的 SOD-1 蛋白质的细胞系。将细胞维持在 G418 选择培养基中 3 周,3 周时去掉药物选择,收集起各转化的细胞型的 G418-抗性菌落以使之进一步生长。在这些研究中使用化合物 14。

将表达所述的 SOD-1 同型的细胞系与不同浓度的化合物 14 温育 24 小时,24 小时通过对免疫印迹的密度扫描测定 SOD-1 的水平。SOD-1 的水平以相对于阴性对照的感应单位数(如上文所述)表示,各数据是三个试验的平均值。化合物 14 的剂量应答分析表明:转化细胞与该 MCP 抑制剂一起温育导致 SOD-1 蛋白质的明显积累,最大的累积量发生在与约 20 μ M 浓度的化合物 14 一起温育的那些细胞中(图 6)。而且, SOD-1 的累积量与各种 SOD 蛋白质的估测半衰期有关;野生型 SOD-1 是最稳定的,而 Ala⁴ \rightarrow Val 是最不稳定的(Borchelt D.R.等, *Proc. Natl. Acad. Sci*(国家科学院进展)91:8292--9296(1994))。这些数据与下列假设一致:FALS 突变使 SOD-1 蛋白不稳定,这可能起因于错折叠(misfolding),并且是由于突变是这些蛋白质被 MCP 降解的目标而导致其结构变化的结果。这些结果还显示化合物 14 还具有令人满意的使野生型 SOD-1 蛋白质更新的明显效果,进一步支持了 MCP 在 SOD-1 降解中的作用。

IV.第4部分

进行试验,以进一步显示 MCP 活性在 SOD-1 更新中的特异性(并排除可能涉及其它主要的蛋白水解途径如钙活化的蛋白酶钙蛋白酶(Calpain)和溶酶体蛋白酶的可能性)。在这些试验中,两个转化的细胞系(如上文所述,一个产生野生型蛋白质,而另一个产生具有 Ala⁴ \rightarrow Val 突变的 SOD-1 蛋白质)与各种蛋白酶抑制剂一起温育,每种抑制剂对独特的蛋白水解活性具特异性:化合物 14 抑制 MCP;“钙肽素(Calpeptin)”(Novabiochem USA, La Jolla, CA,催化酶编号为 03-34-0051;CBZ-Leu-

Nle-乙醛, Biochem. Biophys. Res. Comm.(生物化学生物物理研究通讯)(1988)153:1201), 一种穿透细胞的钙蛋白酶(钙蛋白酶是半胱氨酸蛋白酶)抑制剂; 以及 DK-3(Enzyme Systems Products, Dublin, CA CBZ-Phe-Ala-CHN₂)抑制溶酶体蛋白酶活性。另外, 将细胞与化合物 16 一起温育。化合物 16 与特别优选的本发明化合物(即, 化合物 14)相比, 是一种有较小潜力的 MCP 抑制剂。将表达所述的 SOD-1 同型的细胞系与下列蛋白酶抑制剂一起温育 24 小时: 化合物 14, 20 μ M; 钙肽素, 10 μ M; DK-3, 5 μ M; 化合物 16, 20 μ M; 或者与作为阴性对照的 DMSO 一起温育。与抑制剂温育 24 小时后, 通过对免疫印迹的密度扫描来测定 SOD-1 的含量。如上文所述, SOD-1 的水平以相对于未处理样品的感应单位数来表示。各数据点均为来自三个试验结果的平均值。

结果示于图 7。可以看出, Ala₄ → Val 的突变 SOD-1 的含量是 MCP 活性的函数, 并且仅仅是被优选化合物 14 的特异性抑制才导致 SOD-1 蛋白质积累的明显增多(3 倍)。与钙蛋白酶或溶酶体蛋白酶一起温育, 对于 SOD-1 的含量没有可觉察的作用效果。而且, 以化合物 14 处理导致野生型 SOD-1 积累略有增加, 这是以前在剂量应答研究中也观察到的一个结果。综上所述, 这些研究表明, MCP 活性在转化的 293 细胞系中对于 SOD-1 的含量是至关重要的, 而且化合物 14 对 MCP 的抑制导致 SOD-1 蛋白质在该细胞中增多。

抑制剂的合成

下文提供制备本发明化合物的示例性的合成途径。一旦掌握了本文公开的内容, 其它的合成方案以及对下列合成方案的改进, 对于本领域的技术人员而言是显而易见的。

可用人们熟知的合成步骤, 使用在 Gross 等编著, Academic Press 出版的 The peptides: Analysis, Synthesis, Biology(肽: 分析、合成、生物学), 第 1 卷(1979)中描述的溶液-相技术, 将酰胺键引入本发明的化合物, 这些步骤和技术描述于下文的这实施例 8-11。

如实施例 14-38 所述, 可通过独立地合成并偶合片段 R₁-(CH₂)_n-CH(R₂)-COOH 和 H₂N-CH(R₃)-CONH-R₄(第 I 偶合方法)来制备抑制剂。

或者, 如实施例 39-42 所述, 可通过独立地合成并偶合片段 R₁-(CH₂)_n-CH(R₂)-CONH-CH(R₃)-COOH 和 H₂N-R₄(第 II 偶合方法)来制备它们。

当取代基 Q 含有醛基(即, H_2N-R_4 是自氨基酸如 $H_2N-CH(CH_2R_7)-CHO$ 衍生的氨基醛)时, 可如 Gacek 等在 Tetrahedron(四面体), 30, 4233(1974)所述的或通过实施例 12 所述的步骤来合成所需的缩醛保护的氨基醛。偶合完成后(通过第 I 或 II 偶合方法), 如实施例 11(方法 E)所述, 可去掉保护基以释放自由醛基。

当 Q 是甲基酮或重氮基-、溴或氯甲基酮时(即, 当 H_2N-R_4 是 α -氨基取代的甲基酮或自氨基酸衍生的 α -重氮基-、溴或氯甲基酮时), 第 II 偶合方法特别方便。可自市场购得的酮的氢氯酸盐(Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, Pennsylvania)或者通过将 Boc-保护的氨基酸转化为混合的碳酸酐, 然后再与重氮基甲烷反应来生成重氮基甲基酮来制备酮的氢氯酸盐。如 Kettner 等在 Arch. Biochem. Biophys.(考古学、生物化学、生物物理学)162, 56(1974); Fittkau 在 J. Prakt. Chem.(实验化学期刊)315, 1037(1973)或 Zimmeran 等在 1995 年 6 月 15 日公开的 PCT WO 95/15749 中所描述的, 可通过使重氮基甲基酮与溴化氢或氯化氢反应来制备溴甲基酮和氯甲基酮。

如 Kettner 等在美国专利 4,652,552 中所描述的, 通过使氯甲基酮氢解而制备相应的甲基酮。

当 Q 是 α -二氟甲基甲酮时, 可通过第 II 偶合方法制备并偶合相应的 1-氨基-3,3-二氟-2-丙醇, 并且可通过 Trainor 和 Stein 在美国专利 4,923,890 中所述的步骤将所得的二氟代醇氧化成二氟代酮。

当 Q 是三氟甲基酮(即, H_2N-R_4 是氨基酸衍生的三氟甲基酮, 例如 $H_2N-CH(CH_2-R_7)-COCF_3$)时, 可通过 Imperiali 和 Abeles 在 Biochemistry(生物化学)25, 3760 及其增补页(1986)中所述的方法, 制备所需的酮。

当 Q 是自氨基酸衍生的单氟甲基酮(即, H_2N-R_4 含有氟甲基酮基, 例如 $H_2N-CH(CH_2-R_7)-COCH_2F$)时, 可通过 Palmer 在欧洲专利申请 EP442,754 中所述的步骤, 用 Boc-保护的氨基酸和苄基氟丙二酸镁, 来制备所需的酮。去掉 Boc 保护基后, 可用第 II 偶合方法使胺偶合。或者, 如实施例 42 所述, 通过使相应的醇氧化来制备单氟甲基酮。

35

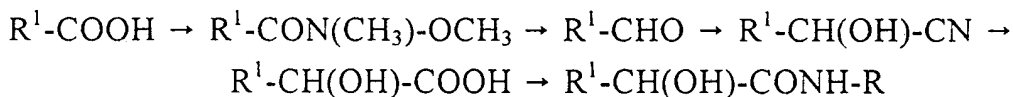
当 Q 是硼代氨基酸衍生物(即, $Q=-B(OH)_2$ 或其环酯)时, 可用如

Shenvi 的美国专利 4,537,773 所述的方法来基本上制备环酯, 在以第 II 偶合方法偶合后, 如 Shenvi 和 Kettner 在美国专利 4,499,082 和 5,187,157 以及 J. Biol. Chem.(生物学化学杂志)259, 15106(1984)中所述的, 该环酯可选择性地被转化成游离肽硼酸。

5

当 Q 是 α -二酮或 α -酮酯(即, $Q=-C(=O)C(=O)R_7$ 或 $-C(=O)CO_2R_7$) 时, 可用 Angelastro 等在 J. Med. Chem. (医学化学期刊)33, 13(1990) 及其参考文献中所述的方法来制备所需的氨基二酮。可将 α -酮酯水解或酰胺化, 生成相应的 α -酮酸或酰胺。也可对 Harbeson 等在 J. Med. Chem.(医学化学期刊)37, 2918-2929(1994)描述的方法加以改进, 以市售购得的 Boc-保护的氨基酸来制备 α -酮酰胺。在极为有用的后一方法中, 所述的 Boc-保护的氨基酸被连续地转化为 N, O-二甲基羟基酰胺、醛、氰醇、 α -羟基羧酸和 α -羟基羧酰胺:

10

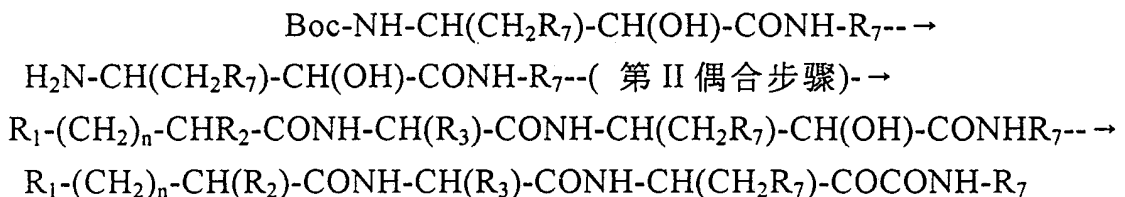


15

其中 $R^1=Boc-NH-CH(CH_2R_7)-$ 。

20

在酸性条件下将 Boc 基去掉, 中和后, 如第 II 偶合方法部分所述, 将自由氨基残基偶合来产生 α -羟基羧酰胺, 然后使后者氧化得到 α -酮羧酰胺抑制剂:



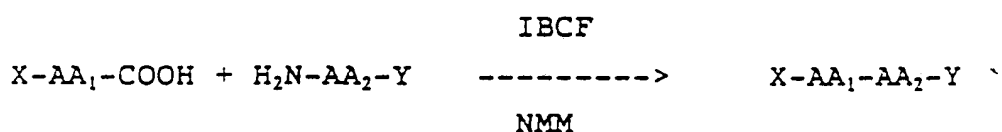
25

实施例 7

方法 A: 混合酐的制法:

方案:

30



35

X=苄基甲基氧羰基(Fmoc)-或叔丁氧基羰基(Boc)-; Y=乙缩醛或保护氨基醛的其它保护基;

AA₁=氨基酸

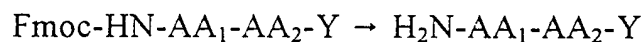
AA₂=氨基醛

5 将 N-甲基吗啉(NMM)(1 当量)加入到被保护氨基酸的四氢呋喃(THF)的搅拌过的溶液中。使混合物冷却到-15 °C, 用氯甲酸异丁酯(IBCf)(1.1 当量)处理, 并使它们反应 10 分钟。随后加入游离碱形式的氨基醛组分, 接下来加入 NMM(1.1 当量, 如果是其酸式盐则加入 2.2 当量)。在-15 °C 搅拌 30 分钟, 然后在室温下搅拌 3-4 小时。将反应混合物溶解于 150-200ml 的乙酸乙酯(EtOAc)中。所得的溶液相继地用水、5%的碳酸氢钠(NaHCO₃)、2%的柠檬酸水溶液洗涤, 最后用水洗涤。以无水硫酸钠(Na₂SO₄)或硫酸镁(MgSO₄)干燥有机层, 在减压下除去溶剂, 由此得到的产物用石油醚研制。将由此得到的固体肽过滤使之干燥并进行特征分析。

15 实施例 8

方法 B: Fmoc-基脱保护步骤:

方案:



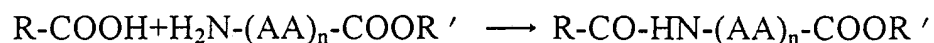
20 在室温下, 用 50-60 倍过量的二乙胺(DEA)将在 30%二甲基甲酰胺(DMF)的乙酸乙酯(EtOAc)溶液混合物中的 Fmoc-保护的肽(0.2-4mmol)处理 2 小时。在减压下于 30 °C 将溶剂蒸发, 向残留物中加入石油醚。当有沉淀形成时, 将它过滤出来并干燥。在其它情况下, 用石油醚对所得的胶状物进行反复研制, 并将胶状物贮存于真空中。

25

实施例 9

方法 C: 对肽进行封端基团或氨基酸的加成:

方案:



30

35

将封端基团(游离羧酸形式)或被保护的氨基酸(1 当量)、六氟磷酸苯并三唑-1-基氧-三(二甲氨基)-磷⁺翁(BOP)(1.1 当量)和 1-羟基苯并三唑(HOBt)(1 当量)溶于 5ml 的 DMF 中, 然后加入 NMM(2.2 当量)。5 分钟后, 加入去保护的碱性肽组分或羧基保护的氨基酸, 将 pH 调至 8, 并搅拌混合物 3-4 小时。然后用 150-300ml 的 EtOAc 稀释该混合物, 并相继地用水、2% NaHCO₃、水、2%柠檬酸和水萃取。蒸发至干, 得到封

端或 N-被保护的肽。

实施例 10

方法 D: 苄氧羰基(CBZ-)去除步骤:

- 5 将 CBZ-保护的肽或氨基酸衍生物(1g)的乙酸乙酯(15ml)溶液与炭上的 0.2g 的 Pd/C(炭上的 10%Pd 含有 50%(重量)的水)混合,并在 40 磅/平方英寸的压力下使之氢化 4 小时。用 Celite[®](硅藻土)过滤溶液,使溶液蒸发至干,得到未被保护的肽或氨基酸衍生物。

10 实施例 11

方法 E: 乙缩醛向醛的转化

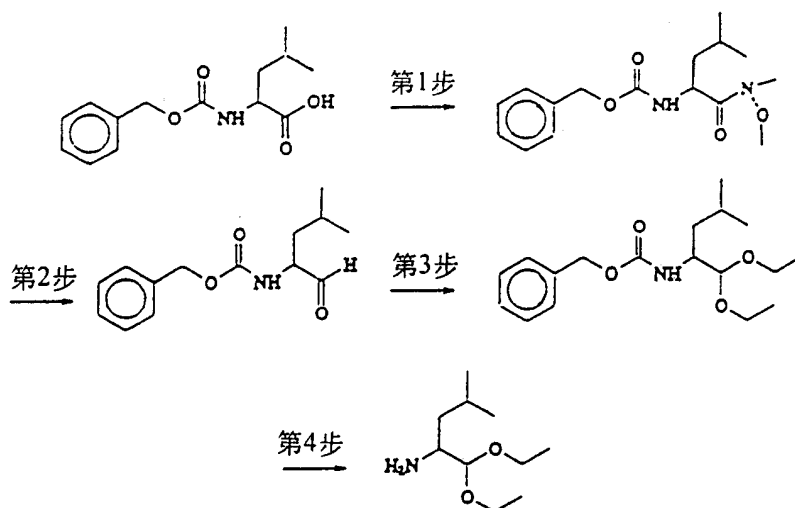
将溶于 3ml THF 的肽乙缩醛(1 当量)溶液与 3ml 盐酸(2M)混合,并搅拌 0.5-2 小时。蒸发除去溶剂,最终残留物用水稀释,并冷冻干燥之,得到肽醛。

15

实施例 12

方法 F: 亮氨酸缩二乙醇的制备

20



25

30

35

第 1 步: 将 NMM(10ml)加入 CBZ-Leu-OH(25g,93mmol)的 THF(250 ml)溶液中。将该溶液冷却至-15 °C,并用 13ml 的氯甲酸异丁酯(BCF)处理,使之反应 10 分钟。随后加入 N, O-二甲基羟胺的氢氯化物(9.36g, 96mmol)的 DMF(40ml)悬浮液和 10ml 的 NMM。搅拌 4 小时后,混合物用 400ml 的 EtOAc 稀释,并且相继地用水、5% NaHCO₃ 溶液、水、2%

柠檬酸和水洗涤该溶液。有机层用 MgSO_4 干燥并蒸发有机层, 得到 19.0g 的无色油。

5 第 2 步: 将第 1 步的油(19g)溶于 200ml 的乙醚中, 并将该溶液冷却到 -78°C 。在 45 分钟内逐滴加入氢化铝锂的乙醚溶液(1.0M)120ml。搅拌该溶液 30 分钟, 在氮气氛下逐滴加入 1M 的硫酸氢钾(KHSO_4) 200ml。分离出有机层, 用 KHSO_4 (1M)溶液洗涤, 以 MgSO_4 干燥, 并蒸发得到无色液体(CBZ-Leu-H)。

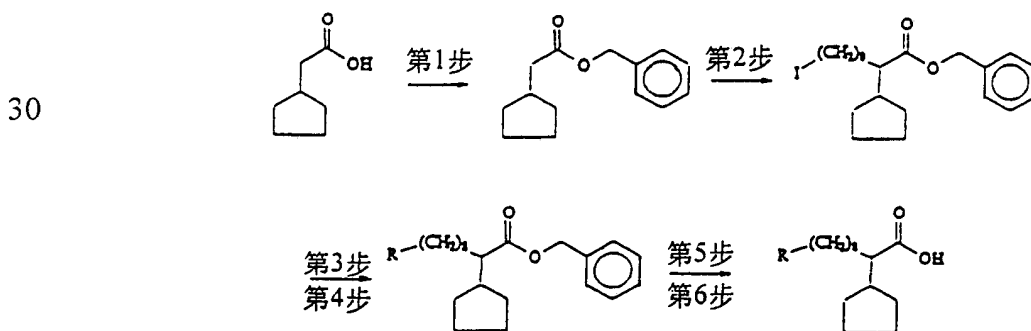
10 第 3 步: 在 30 分钟的时间内, 向 CBZ-Leu-H(12g)和对-甲苯磺酸(0.9g)的无水乙醇(EtOH)(100ml)溶液中加入原甲酸三乙酯 104ml。对混合物搅拌 30 分钟, 然后蒸发之, 并用 500ml 的乙醚稀释。乙醚层相继地用饱和的 NaHCO_3 溶液和氯化钠溶液洗涤。棕黄色的半固体以冷己烷重结晶, 得到了接近于白色的针状 CBZ-亮氨酸缩二乙醇。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 7.28(m, 5H), 5.03(s, 2H), 4.77(d, 1H), 4.27(d, 1H), 3.8(m, 1H), 3.63(m, 2H), 3.43(m, 2H), 1.6(dd, 2H), 1.30(m, 2H), 1.12(m, 6H), 0.83(d, 6H)。

15

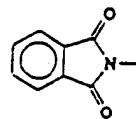
20 第 4 步: 用方法 D, 以 2.5g 的 Pd/C 将第 3 步得到的产物(14.8g)氢化, 得到 4.09g 的亮氨酸缩二乙醇(油状物)。 $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 4.16(d, 1H), 3.70(m, 3H), 3.75(m, 2H), 2.87(m, 1H), 1.78(m, 1H), 1.33(m, 2H), 1.23(m, 6H), 0.935(dd, 6H)。

实施例 13

25 方法 G: P3 mimics(要得知其命名法, 请参见 Schechter, I. 和 Burger, A. (1967) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (生物化学生物物理研究通讯)27: 157-162)的合成



(第3步和第5步, R = -CN; 第4步和第6步, R =



5

第1步: 环戊烷乙酸苄酯的制备:

用 Dean-Stark 水分离器, 将溶于苯(60ml)中的环戊基乙酸
 (10.02g, 78.2mmol)、苄醇(8.45g, 78.2mmol)和一水合对甲苯磺酸
 (1.48g, 7.82mmol)回流 2 小时。冷却后, 除去苯, 用乙醚(50ml)稀释该混
 10 合物, 并相继地用饱和的 NaHCO₃ 溶液、饱和的盐水洗涤, 干燥并蒸发
 该混合物, 得到油状的化合物(15.40g); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃)
 δ: 7.35(m, 5H), 5.10(s, 2H), 2.40(d, j=8 Hz, 2H), 2.26(m,
 1H), 1.81(m, 2H), 1.6(m, 4H), 1.18(m, 2H).

15

第2步: 2-环戊基-10-碘代癸酸苄酯的制备:

向溶于 THF(20ml)和己烷(8ml)混合物的二异丙基酰胺化锂
 (20mmol)(从相应的二异丙基胺和正丁基锂就地制得)的溶液中慢慢地加
 入第1步得到的化合物(3.96g, 18mmol)的无水 THF(10ml)溶液。对该混
 合物搅拌 30 分钟, 并加入 1,8-二碘辛烷(7.19g, 20mmol)的六甲基磷酰胺
 20 (3.50g, 20mmol)溶液。在 -78 °C, 对混合物搅拌 30 分钟, 在 2 小时内使
 之慢慢地冷却到 0 °C, 并小心地加入 50ml 12% 的氯化钠水溶液而使反
 应终止。该混合物用乙醚萃取、用盐水洗涤, 使之干燥并使溶剂蒸发。
 纯化粗产物以得到油状物(3.23g)。用己烷到 1% EtOAc 的己烷溶液作洗
 脱液, 在硅胶柱上对所得的油状物进行快速色谱分析。 ¹H NMR(300
 25 MHz, CDCl₃) δ: 7.35(m, 5H), 5.15(s, 2H), 3.20(t, 8Hz, 2H),
 2.20(m, 1H), 2.0(m, 1H), 1.2-1.8(m, 22H).

第3步: 10-氰基-2-环戊基癸酸苄酯的制备:

将溶于 15ml 无水 DMSO 中的得自第2步的碘代酯(3.99g, 8.7mmol)
 30 和氰化钠(0.47g, 9.6mmol)的混合物在 70-75 °C 加热 30 分钟。冷却后, 将
 反应混合物倾倒在冰(约 40g)上, 萃取进乙醚, 并相继地用水和饱和的
 盐水洗涤。浓缩有机层, 得到油状物(2.89g)。 ¹H NMR(300 MHz, CDCl₃)
 δ: 7.35(m, 5H), 5.15(s, 2H), 2.30(t, 8Hz, 2H), 2.20(m, 1H),
 2.00(m, 1H), 1.3-1.8(m, 22H).

35

第四步: 10-N-苯二甲酰亚氨基-2-环戊基癸酸苄酯的制备:

将溶于 8ml DMF 中的得自第 2 步的化合物(1.21g,2.6mmol)和苯邻二甲酰亚胺化钾(0.536g,3mmol)的混合物于 70-75 °C 加热 30 分钟。冷却后,将反应混合物倾至冰(约 40g)上,并萃取进 60ml 的乙醚中。合并的有机层用水和饱和的食盐水洗涤,并将之浓缩至无色的油状物(1.24g),
 5 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :7.85(m, 2H), 7.70(m, 2H), 7.35(m, 5H), 5.10(s, 2H), 3.65(t, 8Hz, 2H), 2.20(m, 1H), 2.00(m, 1H), 1.22-1.18(m, 22H).

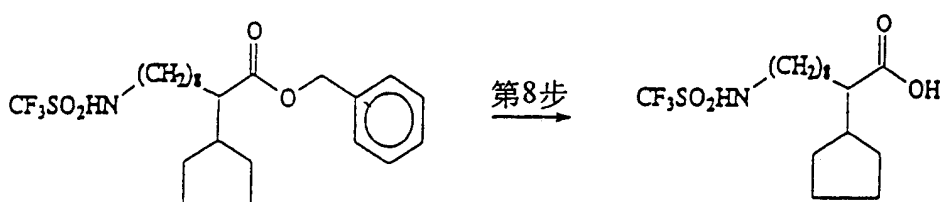
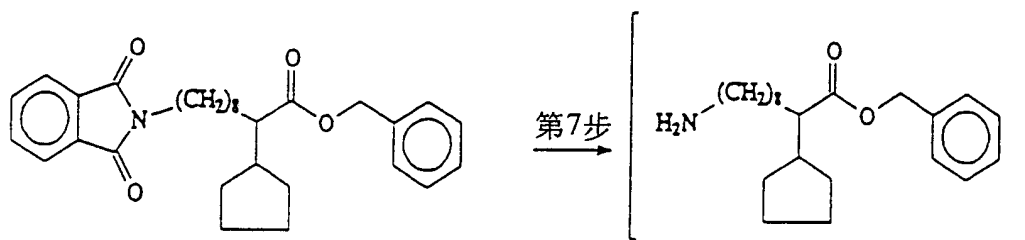
第 5 步: 10-氰基-2-环戊基癸酸的制备:

10 将得自第 3 步的氰基酯(2.89g,8mmol)和 10% Pd/C(0.6g,DeGussa,含水量为 50%)的混合物在无水甲醇(MeOH)(35ml)中氢化 2 小时(42-26 磅/平方英寸)。使反应混合物过滤通过 Celite[®]垫,并将其浓缩为无色的油状物(2.02g)。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :2.35(t, 8Hz, 2H), 2.20(m, 1H), 2.00(m, 1H), 1.3-1.9(m, 22H).

15 第 6 步: 2-环戊基-10-N-苯二甲酰亚氨基-癸酸的制备:

按照第 5 步的步骤,将第 4 步制得的产物(0.41g)转化成题述化合物(0.31g)。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ :7.85(m, 2H), 7.70(m, 2H), 3.70(t, 8Hz, 2H), 2.15(m, 1H), 1.95(m, 1H), 1.10-1.85(m, 22H).
 20

第 7 步: 10-三氟甲基磺酰氨基-2-环戊基-癸酸苄酯的制备:

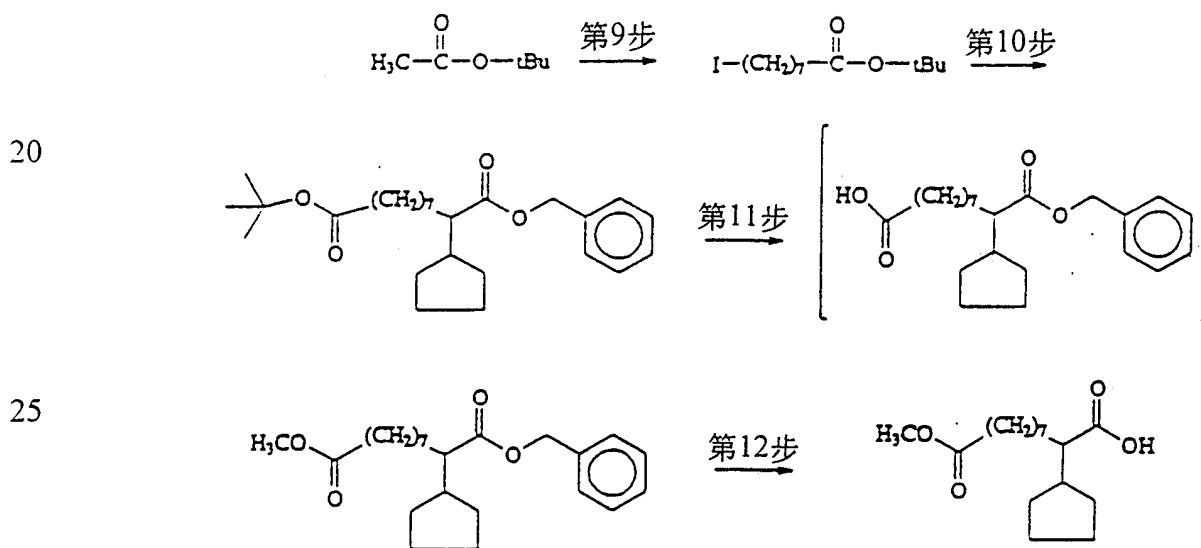


35 将溶在甲醇(8ml)中的得自第 4 步的酯(0.847g,1.7mmol)和一水合肼

(0.425g, 0.41ml, 8.5mmol)的混合物边回流边加热 30 分钟, 使其浓缩, 并用乙醚研制残留物, 得到白色沉淀, 将沉淀过滤出来。浓缩滤液以得到油状物(0.540g)。将该油状物溶解于 CH_2Cl_2 (8ml)中, 冷却到 -10°C , 并向其中加入三乙胺(0.324ml), 然后加入三氟甲基磺酰氯(0.25ml)。在 1 小时内使温度缓慢升至室温。然后用水、2% HCl、水和饱和的盐水洗涤该反应混合物。浓缩有机层至油状, 用 10% EtOAc 的己烷溶液作洗脱剂, 用硅胶柱以快速色谱法纯化之, 得到油状的 10-三氟甲基磺酰氨基-2-环戊基-癸酸苄酯(0.25g)。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)
 δ : 7.35(m, 5H), 5.15(s, 宽峰, 1H), 5.10(s, 2H), 3.25(m, 1H), 2.20(m, 1H), 2.00(m, 1H), 1.10-1.7(m, 22H)。

第 8 步: 2-环戊基-10-(三氟甲基磺酰氨基)-癸酸的制备:

按照与在第 5 步中所述的相同的步骤, 将第 7 步制得的化合物(0.25g)转化成题述化合物(0.20g)(油状物)。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)
 δ : 6.60-5.60(b, 1H), 3.30(d, 8Hz, 2H), 2.15(m, 1H), 1.90(m, 1H), 1.1-1.8(m, 22H)。



第 9 步: 8-碘辛酸叔丁酯的制备:

按照制备第 2 步化合物所述的步骤, 以乙酸叔丁酯(1.16g)和 1,6-二碘己烷(4.06g)合成题述化合物(油状物)(2.13g)。 $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 3.20(t, 8Hz, 2H), 2.20(t, 8Hz, 2H), 1.75-1.85(m, 2H), 1.55-1.65(m, 2H), 1.45(s, 9H), 1.25-1.43(m, 6H)。

35

第 10 步: 2-环戊基癸-1,10-二酸-1-苄酯-10-叔丁酯的制备:

用第2步中所述的步骤,使第1步制得的酯(6.92g)和自第9步制得的碘代酯(11.37g)反应,生成油状的题述化合物(7.44g)。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ:7.35(m, 5H), 5.10(s, 2H), 2.20(m, 3H), 2.00(m, 1H), 1.45(s, 9H), 1.0-1.9(m, 20H)。

5

第11步: 2-环戊基癸-1,10-二酸-1-苄酯-10-甲酯的制备:

第10步制得的二酯(2.86g,7mmol)的CH₂Cl₂(30ml)溶液和10ml 90%的TFA一起搅拌30分钟。将蒸发后得到的产物溶解于CH₂Cl₂(10ml)和MeOH(6ml)的混合物中。在-20℃下搅拌溶液,在2小时内向该溶液中缓慢加入亚硫酸氯(6ml)。将溶剂蒸发掉,并将残留物溶解于乙醚(20ml)中。有机层相继地用饱和的NaHCO₃溶液、水和盐水洗涤,使之干燥、蒸发,并用硅胶柱(洗脱液为2% EtOAc-己烷)以快速色谱纯化,得到油状的产物(2.05g)。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ:7.35(m, 5H), 5.10(s, 2H), 3.65(s, 3H), 2.30(t, 8H, 2H), 2.20(m, 1H), 2.00(m, 1H), 1.10-1.90(m, 10H)。

10

15

第12步: 2-环戊基癸-1,10-二酸-10-甲酯的制备:

用第5步所述的步骤,将第11步制得的化合物(4.96g)转化成油状的题述化合物(3.66g)。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ:3.65(s, 3H), 2.30(t, 8H, 2H), 2.15(m, 1H), 2.00(m, 1H), 1.10-1.19(m, 20H)。

20

第13步: 6-氰基己烷-1-磺酸钠的制备:

向装有水冷凝器、机械搅拌器和滴液漏斗的三颈瓶中,装入溶于75ml 95%乙醇(EtOH)的1-溴-6-氰基己烷(8.04,42.3mmol)溶液。将混合物加热至回流,并在30分钟内向其中缓慢加入溶于50ml水的亚硫酸钠(8.00g,63.5mmol)的溶液。将混合物加热2小时,然后在减压下浓缩之。将残留物溶解于95%的EtOH(200ml)中,加热至沸腾并过滤之。将滤液浓缩并在冰浴上冷却。过滤收集沉淀物,使沉淀物干燥得到白色固体3.00g。对母液进一步浓缩,产生另一批产物2.2g。¹H NMR(300 MHz, DMSO-d₆) δ:2.50(t, j=8Hz, 2H), 2.40(t, 8Hz, 2H), 1.55(m, 4H), 1.3(m, 4H)。

25

30

35

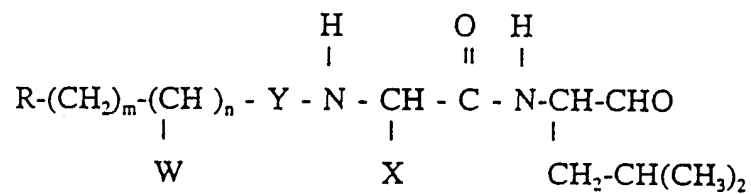
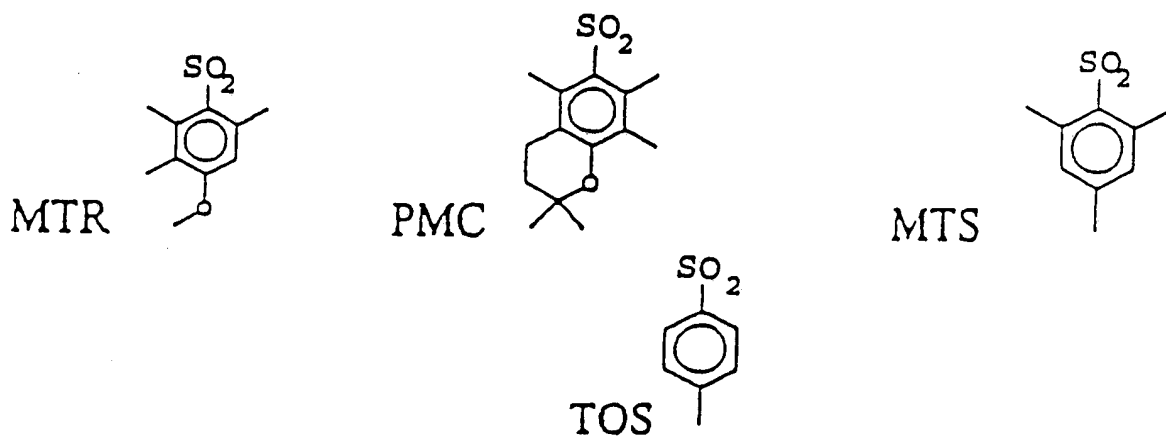
第14步: 6-氰基己烷-1-磺酰氯的制备:

5 将自第 13 步制得的产物(0.340g,1.6mmol)、亚硫酰氯(0.95g,8mmol)和一滴 DMF 的混合物在 75-80 °C 下加热 30 分钟。冷却后, 除去溶剂, 残留物用冰水(5ml)处理。将有机层萃取进 30ml 的乙醚中, 混合的有机层用 3% NaHCO₃ 溶液和水洗涤, 以 MgSO₄ 干燥并过滤。用活性炭(Darco)处理滤液, 将之过滤并浓缩, 以得到无色的油(0.240g), 该油无需进一步的纯化而可直接使用。

实施例 14-38 描述了表 5 中所列的 MCP 抑制剂的合成。相应的纯化条件列于表 6。

表 5(续)

32	MeOOC-	6	H	MTR	(CH ₃) ₂ CH-	N- NHCONH ₂	220
33	MeOOC-	6	H	MTR	(CH ₃) ₂ CH-	N- NHCSNH ₂	700
34	MeOOC-	6	H	MTR	(CH ₃) ₂ CH	o	80
35	MeOOC-	6	H	MTS	(CH ₃) ₂ CH	o	40



实施例 编号	R	m	n	W	X	Y	IC ₅₀ nM
36	NC-	5	1	H	PMC-NH-C(=NH)-NH-(CH ₂) ₃ -	-SO ₂ -	≥ 100
37	β- Naphthyl	0	0	-	O ₂ N-NH-C(=NH)-NH-(CH ₂) ₃ -	o -c-	250
38	H CBZ-N-	5	1	H	O ₂ -N-NH-C(=NH)-NH-(CH ₂) ₃ -	o -c-	...

表6

实施 例号	化合物	HPLC梯度(收集 峰的保留时间)	分析 保留时间 (分钟)	分子量	(M+H) ⁺
14	10-氰基-2-环戊基癸酰基-N ⁵ -硝基-L-精氨酸 基-L-亮氨酸	45-75%B (10.63)	22.5	563.75	564
15	10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N ⁵ -(2,2,5,7,8-五甲基苯并 二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸	43-100%B (22.0)	31.7	785.2	786
16	10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N ⁵ -硝基-L-精氨酸基-L- 亮氨酸缩氨基脲	30-35%B 60分钟 (A=30.0, B=32.0)	22.2 22.7	621	621
17	10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N ⁵ -硝基-L-精氨酸基-L- 亮氨酸脲	45-65%B (12.3)	24.8	578.7	579
18	10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N ⁵ -硝基-L-精氨酸基-L- 亮氨酸-O-甲基脲	55-75%B (A=8.9, B=10.12)	27.7	592.7	593
19	10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N ⁵ -硝基-L-精氨酸基-L- 亮氨酸-O-苯脲	65-75%B (A=8.3, B=9.5)	31.3	668.7	669
20	9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N ⁵ -(2,2,5,7,8-五甲 基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸	60-100%B (14.1)	32.0	804.11	805
21	9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N ⁵ -(4-甲氧基-2,3,6- 三甲基-苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸	40-60%B (29.9)	28.9	749	750
22	9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N ⁵ -(2,2,5,7,8-五甲 基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-正亮氨酸	60-70%B (18.8)	32.2	804	804

表6(续)

23	9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N ⁶ -硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸	40-70%B (13.98)	23.6	582.34	583
24	2-环戊基-10-N-苯三甲酰亚氨基-癸酰基-N ⁶ -硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸	50-80%B (12.66)	27.89	683.86	684
25	10-(三氟甲基磺酰基)氨基-2-环戊基-癸酰基-N ⁶ -硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸	50-70%B (A=12.1, B=12.9)	27.20 27.46	686.02	686
26	单甲基酯壬二酰基-N ⁶ -硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸	30-100%B (8.14)	17.06	501	501
27	单甲基酯壬二酰基-N ⁶ -硝基-L-精氨酸基-L-苯丙氨酸	10-100%B (16.9)	17.3	534	535
28	单甲酯壬二酰基-N ⁶ -(2,2,5,7,8-五甲基苯并三氢吡啶-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸	10-100%B (11.7)	26.5	722	723
29	单甲酯壬二酰基-N ⁶ -(2,2,5,7,8-五甲基苯并三氢吡啶-6-磺酰基)-D-精氨酸基-L-亮氨酸	40-70%B (16.2)	26.3	722	723
30	单甲酯壬二酰基-N ⁶ -(2,2,5,7,8-五甲基苯并三氢吡啶-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-正亮氨酸	50-60%B (14.0)	26.2	722	723
31	单甲酯壬二酰基-N ⁶ -(对甲苯磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸	40-50%B (19.6)	21.3	610	610
32	单甲酯壬二酰基-N ⁶ -(4-甲氧基-2,3,6-三甲苯基-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩氨基脲	-	13.2	724	725

表6(续)

33	单甲酯壬二酰基-N ⁶ -(4-甲氧基-2,3,6-三甲苯基-1-磺酰基)-L-精氨酸-L-亮氨酸缩氨基硫脲	-	23.4	741	741
34	单甲酯壬二酰基-N ⁶ -(4-甲氧基-2,3,6-三甲苯基-1-磺酰基)-L-精氨酸-L-亮氨酸	40-44%B (60分钟) (16.9)	23.3	668	669
35	甲氧基壬二酰基-N ⁶ -(2,4,6-三甲苯基-1-磺酰基)-L-精氨酸-L-亮氨酸	40-60%B (14.1)	32.0	638	638
36	6-氰基-己烷-1-磺酰基-N ⁶ -(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸-L-亮氨酸	45-75%B (13.74)	24.94	710.9	711
37	2-萘甲酰基-N ⁶ -硝基-L-精氨酸-L-亮氨酸	35-55%B (9.16)	18.10	470.51	471
38	CBZ-7-氨基庚酰基-N ⁶ -硝基-L-精氨酸-L-亮氨酸	30-60%B (A=13.3, B=13.9)	19.1	577	578

HPLC 条件:

溶剂 A: 含 0.1%TFA 的水

溶剂 B: 含 0.1%TFA 乙腈

检测: 215nm

HPLC 梯度在 40 分钟内完成(除非另有说明)

柱型:

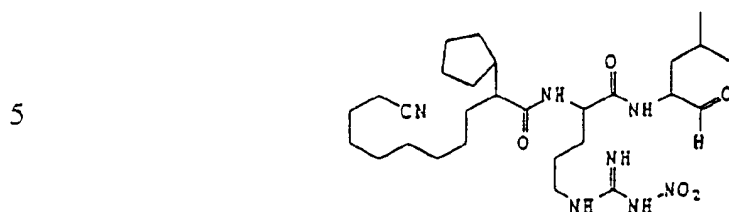
Zorbax Rx-C₈

尺寸: 4.6mm × 250mm

孔径大小: 80Å °

颗粒大小: 5 μ m

实施例 14

10-氰基-2-环戊基癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸第 1 步: 苄基甲氧基羰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩乙二醇

10 用 1.29ml 的 IBCF, 2.2ml 的 NMM 和 10ml 的 THF(代替实施例 7
方法 A 中的 DMF), 按照方法 A(实施例 7), 将 Fmoc-Arg(NO₂)-OH(4.41g,
10mmol)与 Leu-乙缩醛(1.89g, 10mmol)偶合。得到的粗产物肽是无定
形的固体。¹H NMR(300MHz, CDCl₃), δ 7.75(d, 2H), 7.55(d,
2H), 7.4(m, 2H), 7.29(m, 2H), 6.21(d, 1H), 5.91(d, 1H),
15 4.30(m, 5H), 3.66(m, 3H), 3.63(d, 2H), 3.32(m, 2H),
1.72(m, 4H), 1.29(m, 2H), 1.17(b, 6H), 0.89(m, 6H)。

第 2 步: N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩乙二醇

20 用去保护方法 B(实施例 8), 将第 1 步制得的产物(3.5g)的 Fmoc 基
团除去。得到半固体状的游离的碱(2.5g)。¹H NMR(300MHz, DMSO-
D₆), δ 8.6(b, 1H), 7.61(d, 1H), 4.27(d, 1H), 3.90(m, 1H),
3.59(m, 1H), 3.45(m, 4H), 3.14(m, 2H), 1.54(m, 4H),
1.33(m, 3H), 1.10(tt, 6H), 0.83(dd, 6H)。

25

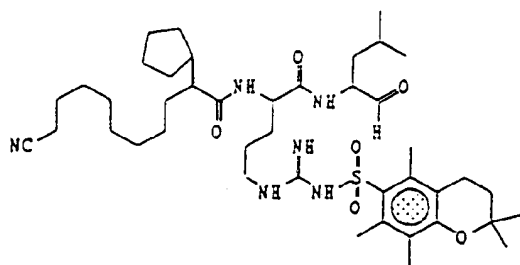
第 3 步: 10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸
缩乙二醇

按照方法 C(实施例 9), 用 BOP(3.34g, 7.5mmol)和 HOBT(1.01g,
7.5mmol), 处理第 2 步的产物(2.15g, 5.5mmol)和溶在 16ml DMF 中的
30 10-氰基-2-环戊基-癸酸(得自方法 G)(2g, 7.5mmol), 得到淡黄色固体的
粗肽。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 8.31(bd, 1H), 8.0(bd,
1H), 7.83(d, 1H), 4.34(m, 1H), 4.24(d, 1H), 3.91(m, 1H),
3.56(m, 4H), 3.43(m, 2H), 3.16(m, 2H), 2.47(t, 3H), 2.03(m,
35 1H), 1.76(m, 2H), 1.15-2.0(m, 25H), 1.07(m, 6H), 0.81(d,
6H)。

第4步：将第3步制得的产物(0.2g)溶在含30%TFA的10ml乙腈(ACN)中，搅拌该溶液1小时，并使溶剂蒸发掉，用乙醚沉淀出化合物14。HPLC纯化的条件列于表6。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆), δ 9.38(s, 1H), 8.56(b, 1H), 8.3(d, 1H), 7.99(dd, 1H), 4.38(m, 1H), 4.17(m, 1H), 3.37(m, 4H), 3.17(m, 2H), 2.26(t, 3H), 1.0-2.0(m, 27H), 0.86(dd, 6H)。

实施例 15

10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸



第1步：10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇

按照方法C(实施例9)，将10-氰基-2-环戊基-癸酸(2mmol，得自实施例13方法G的第5步)与N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇(1.8mmol，得自化合物14的第2步)偶合，得到该固体化合物。

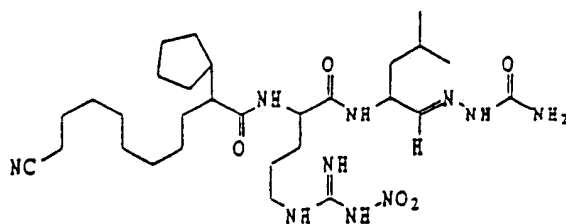
第2步：10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

按照方法E(实施例11)，将第1步制得的产物(0.3g)转化成化合物15，并以HPLC纯化之。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 9.38(s, 1H), 8.23(d, 1H), 7.8(s, 1H), 7.72(d, 1H), 7.49(t, 1H), 7.48(s, 1H), 4.34(m, 1H), 4.14(m, 1H), 3.05(m, 2H), 2.60(t, 2H), 2.50(s, 3H), 2.46(s, 3H), 2.25(m, 4H), 2.00(s, 3H), 1.74(t, 2H), 1.6-1.0(m, 25H), 1.13(s, 6H), 0.82(dd, 6H)。

实施例 16

10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩氨基脒

5



10

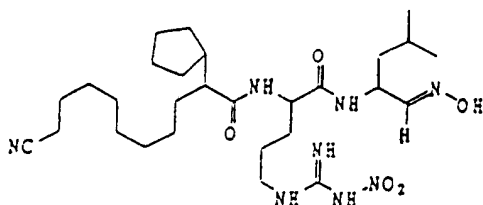
将氢氯酸氨基脒(0.20mmol)、乙酸钠(0.3mmol)和水(0.5ml)加入化合物 14(0.050g, 0.089mmol)的乙醇(4.5ml)溶液中, 在室温搅拌过夜。除去溶剂, 如表 6 所示, 以 HPLC 对所得的化合物 16 进行纯化。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 9.91(s, 1H), 8.51(s, 2H), 8.04(d, 1H), 7.95(d, 1H), 7.40(s, 1H), 7.09(d, 1H), 6.29(s, 2H), 4.44(m, 1H), 4.33(m, 1H), 3.16(s, 2H), 2.08-1.00(m, 33H), 0.87(dd, 6H).

15

实施例 17

10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸脒

20



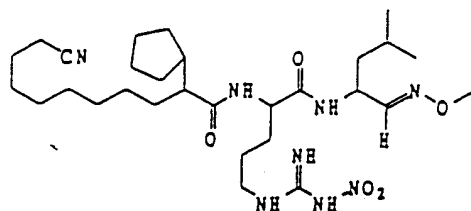
25

室温下,将氢氯酸脒(0.037g,0.534mmol)加入实施例 14 的第 4 步产物(0.05g,0.089mmol)的嘧啶(0.174g,2.2mmol)溶液中,然后于 80 °C 加热 30 分钟。如表 6 所示,产物以 HPLC 分离。

实施例 18

10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸-O-甲基脒

30



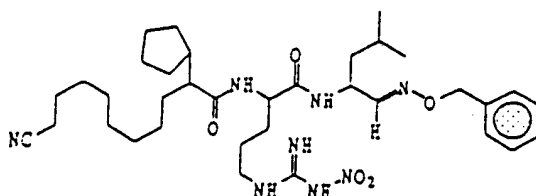
35

按照实施例 17 的步骤,用氢氯酸 O-甲基脒(0.03g,0.38mmol)制备化合物 18,如表 6 所示,它是以 HPLC 的两个峰的混合物形式而被分离出来的。

实施例 19

10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸-O-苄肟

5



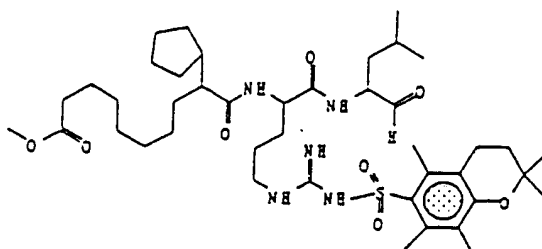
10

按照实施例 17 的制备步骤,用化合物 14(0.05g,0.089mmol)、氢氯酸 O-苄基胍(0.043g,0.267mmol)和嘧啶(0.092ml,1.14mmol)制备化合物 19。在以 HPLC 纯化时,该化合物以两个峰而被分离出来。

实施例 20

9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

15



20

第 1 步: Fmoc-N-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇

25

按照方法 C(实施例 9),用溶在 12ml DMF 中的 BOP(2.21g,5mmol)、HOBT(0.67g,5mmol)和 NMM(0.7ml),将 Fmoc-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸(3.31g,5mmol)与 L-亮氨酸缩二乙醇(0.85g,得自方法 F, 实施例 12)偶合,得到二肽乙缩醛(3.24g)。¹H NMR(300M Hz, CDCl₃) δ 7.89(s, 1H)7.78(d, 2H), 7.6(d, 2H), 7.4(t, 2H), 7.31(t, 3H), 6.4(d, 2H), 5.92(d, 1H)4.58(m, 1H), 4.43(m, 1H), 4.35(m, 3H), 3.69(m, 2H), 3.53(m, 2H), 3.30(m, 2H), 2.6(t, 2H), 2.58(s, 6H), 2.12(s, 3H), 1.80(tt, 2H), 1.64(m, 3H), 1.32(m, 10H), 1.18(q, 6H), 0.89(t, 6H)。

30

35

第 2 步: N^ε-(2,2,5,7,8)-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

按照方法 B(实施例 8), 除去第 1 步产物(1.6g)的 Fmoc 基团, 产生半固体(1.3g)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ 7.6(d, 1H), 6.76(b, 1H), 6.46(B, 1H), 4.27(d, 1H), 3.9(m, 1H), 3.58(m, 1H), 3.44(m, 4H), 3.11(t, 1H), 3.01(m, 2H), 2.58(t, 2H), 2.47(s, 6H), 2.03(s, 3H), 1.77(t, 2H), 1.5(m, 5H), 1.26(s, 6H), 1.09(m, 6H), 0.83(dd, 6H)。

第 3 步: 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇

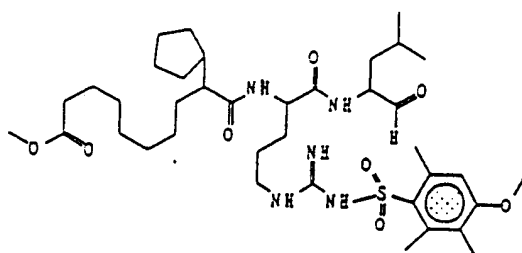
按照方法 C(实施例 9), 用溶在 5ml DMF 中的 BOP(0.66g, 1.5mmol) 和 NMM(2.2ml, 2mmol), 将 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酸(0.56g)与 N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇(0.7g, 1.1mmol)偶合得到固体产物(1.8g)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 7.5-8.0(m, 2H), 6.66(m, 1H), 6.4(m, 1H), 4.32(m, 1H), 4.24(d, 1H), 3.93(m, 1H), 3.57(m, 6H), 3.44(m, 4H), 3.04(m, 2H), 2.59(t, 2H), 2.48(s, 6H), 2.28(m, 3H), 2.03(s, 3H), 1.77(t, 2H), 1.48(m, 22H), 1.26(s, 6H), 1.1(tt, 9H), 0.81(dd, 6H)。

第 4 步: 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

根据方法 E(实例 11), 将第 1 步的产物(0.2g)转化成化合物 20, 并以 HPLC 直接纯化之。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.37(s, 1H), 8.2-7.4(m, 2H), 6.69(drm, 1H), 6.4(brm, 1H), 4.3(m, 2H), 3.58(s, 3H), 3.03(m, 2H), 2.60(t, 2H), 2.48(s, 6H), 2.26(m, 4H), 2.03(s, 3H), 1.77(t, 2H), 1.47(brm, 28H), 1.24(s, 3H), 0.80(dd, 6H)。

实施例 21

9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-(4-甲氧基-2,3,6-三甲基-苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸



第 1 步: 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-(4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩乙二醇

5

按照方法 C(实施例 9), 将 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酸(1.2mmol, 得自方法 G 的第 12 步)与 N^ε-(4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩乙二醇(1.0mmol)偶合, 得到固态的肽。

10

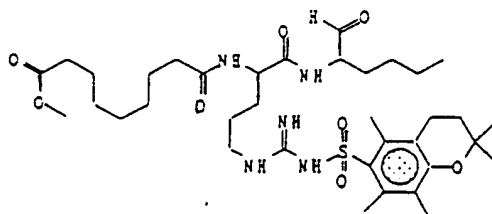
第 2 步: 按照方法 E(实施例 11), 将得自第 1 步的乙缩醛转化成化合物 21, 并以 HPLC 纯化。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.42 (s, 1H), 8.25(d, 1H), 7.92(d, 1H), 7.84(s, 1H), 6.4(m, 2H), 4.40(m, 1H), 4.20(m, 1H), 3.80(s, 3H), 3.57(s, 3H), 3.26(m, 2H), 2.64(s, 3H), 2.55(s, 3H), 2.36(m, 2H), 2.07(s, 3H), 1.8-1.0(m, 30H), 0.87(dd, 6H)

15

实施例 22

9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-正亮氨酸

20



25

第 1 步: 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-正亮氨酸缩乙二醇

30

采用方法 C(实施例 9), 用溶在 5ml DMF 中的 BOP(1mmol)、HOBT(1 mmol)和 NMM(2.5mmol), 将 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酸(1mmol)与 N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-正亮氨酸缩乙二醇(0.69mmol, 得自按照方法 B 的实施例 30 的第 1 步)偶合。将反应混合物搅拌 4.5 小时, 并将肽分离出来(0.37g, 0.42mmol)。

35

第2步: 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸酰基-L-正亮氨酸

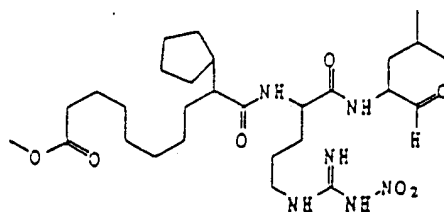
5 根据方法 E(实例 11), 将第 1 步的产物(0.37g,0.42mmol)转化成化合物 22(0.33g), 并以 HPLC 纯化之。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.29(s, 1H), 7.79(d, 1H), 7.89(d, 1H), 7.31(t, 1H), 7.26(s, 2H), 4.17(m, 1H), 3.94(m, 1H), 3.49(s, 3H), 2.94(m, 2H), 2.74(t, 2H), 2.51(t, 2H), 2.37(s, 6H), 2.20(m, 4H), 1.94(s, 3H), 1.14(s, 6H), 1.0-1.8(m, 3H), 0.74(t, 3H).

10

实施例 23

9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸

15



20

第 1 步: 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸缩二乙醇

25

按照方法 C(实施例 9), 用溶在 7ml DMF 中的 BOP(0.146g,0.33mmol)、HOBT(0.0449g,0.33mmol)和 NMM(0.105ml,0.95mmol), 将 9-甲氧基羰基-2-环戊基-壬酸(0.66g,0.33mmol)与实施例 14 中的第 2 步产物(0.109g, 0.28mmol)偶合, 得到第 1 步的题述产物(0.124g)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 8.31(m, 2H), 6.69(br d, 1H), 6.15(br d, 1H), 4.5(m, 1H), 4.33(m, 1H), 4.18(m, 1H), 3.67(s, 3H), 3.53(m, 4H), 3.32(m, 2H), 2.68(m, 2H), 2.29(t, 3H), 2.0-1.0(bm, 34H), 0.90(dd, 6H).

30

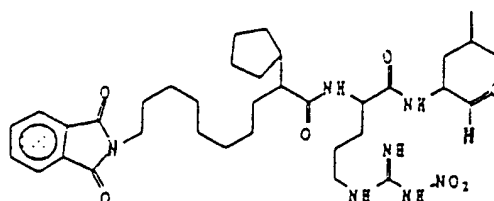
35

第 2 步: 按照方法 E(实施例 11), 将该肽(得自第 1 步, 0.124g)转化成化合物 23(0.106g)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.39(s, 1 H), 8.54(m, 1H), 8.31(d, 1H), 7.99(brd, 2H), 4.36(m, 1H), 4.15(m, 1H), 3.33(s, 3H), 3.16(m, 2H), 2.27(t, 2H), 2.03(m, 2H), 1.0-1.7(m, 28H), 0.83(dd, 6H).

实施例 24

2-环戊基-10-N-苯二甲酰亚氨基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸

5



10

第 1 步: 2-环戊基-10-N-苯二甲酰亚氨基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸缩乙二醇

15

按照方法 C(实施例 9), 用溶在 5ml DMF 中的 BOP(0.288g, 0.65mmol)、HOBT(0.088g, 0.65mmol)和 NMM(0.130ml, 0.130mmol), 将方法 G(实施例 13)中的第 6 步的产物(0.25g, 0.65mmol)与实施例 14 的第 2 步的产物(0.195g, 0.5mmol)偶合, 得到固态的题述化合物(0.557g). ¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 8.57(br m, 1H), 7.91(d, 1H), 7.85(br d, 4H), 7.55(d, 1H), 4.32(m, 1H), 4.23(dd, 1H), 3.90(m, 1H), 3.55(t, 3H), 3.43(m, 4H), 3.14(m, 2H), 2.0(br m, 1H), 1.74(br m, 2H), 2.0-1.15(2 br m, 28H), 1.09(tt, 6H), 0.79(dd, 6H).

20

25

第 2 步: 2-环戊基-10-N-苯二甲酰亚氨基-癸酰基-N^ε-硝基-精氨酸酰基-L-亮氨酸

30

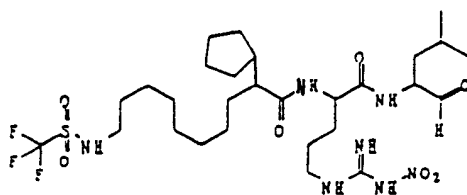
采用方法 E(实施例 11), 将第 1 步的产物(0.45g)转化成化合物 24(0.32g). ¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.38(s, 1H), 8.31(d, 1H), 8.00(d, 1H), 7.85(m, 4H), 4.38(m, 1H), 4.15(1, 1H), 3.57(tt, 3H), 3.15(m, 2H), 2.00(m, 1H), 1.9-1.0(br m, 30H), 0.86(dd, 6H).

实施例 25

35

10-(三氟甲基磺酰基)氨基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸

5



第 1 步: (三氟甲基磺酰基)10-氨基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸-L-亮氨酸缩二乙醇

10

采用方法 C(实施例 9), 用溶在 5ml DMF 中的 BOP(0.22g,0.51 mmol)、HOBt(0.069g,0.51mmol)和 NMM(0.052ml,0.47mmol), 将 10-(三氟甲基磺酰基)-氨基-2-环戊基-癸酸(0.199g,0.51mmol)与实施例 14 的第 2 步产物(0.175g,0.45mmol)偶合。得到的乙缩醛为固体(0.42g)。¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆) δ: 6.06(br m, 1H), 5.81(m, 1H), 4.53(m, 1H), 4.32(d, 1H), 4.13(m, 1H), 3.73(q, 4H), 3.53(m, 2H), 3.30(q, 3H), 2.0-1.0(2br m, 36H), 0.9(dd, 6H)。

15

第 2 步: 10-(三氟甲基磺酰基)氨基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸-L-亮氨酸

20

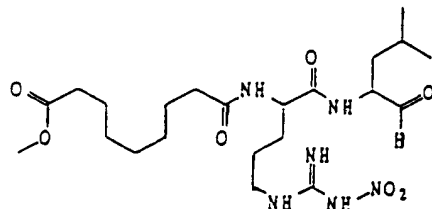
按照方法 E(实施例 11), 将第 1 步的产物(0.35g)转化成化合物 25 (0.17g)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.27(s, 1H), 8.46(br m, 1H), 4.30(m, 1H), 3.87(m, 1H), 3.09(m, 5H), 2.8-1.0(2 br m, 30H), 0.78(dd, 6H)。

25

实施例 26

单甲基酯壬二酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸-L-亮氨酸

30



第 1 步: 单甲基酯壬二酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸-L-亮氨酸缩二乙醇:

35

按照方法 C(实施例 9), 用溶在 12ml DMF 中的壬二酸单甲基酯 (0.708g, 3.5mmol)、BOP(1.55g, 3.5mmol)、HOBT(0.47g, 3.5mmol)、NMM(0.38ml, 3.5mmol)、N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩乙二醇(得自按照方法 B(实施例 8)的实施例 14 的第 2 步)(1.306g, 3.5mmol), 制备题述化合物。所得的肽为无定形固体(2.17g)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ:

5

6.58(d, 1H), 6.04(d, 1H), 4.47(m, 1H), 4.30(d, 1H), 4.17(m, 1H), 3.67(s, 3H), 3.53(m, 2H), 3.2-3.4(t, d, 2H), 2.3(m, 3H), 2.2(t, 1H), 1.83(m, 1H), 1.2-1.8(m, 24H), 1.2(m, 3H), 0.9(d, 3H).

10

第 2 步: 单甲基酯壬二酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸:

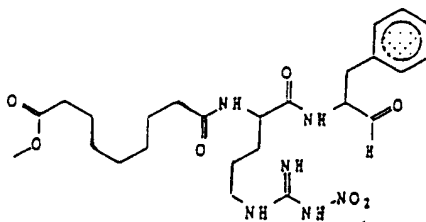
15

采用方法 E(实施例 11), 将肽乙缩醛(得自第 1 步)(250mg)转化成化合物 26(0.22g)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.38(s, 1H), 7.73(d, 1H), 4.30(m, 1H), 4.09(m, 1H), 3.57(s, 3H), 3.15(m, 2H), 3.01(q, 1H), 2.75(m, 1H), 2.24(m, 7H), 1.50(m, 12H), 1.24(b, 14H), 0.86(m, 6H)

实施例 27

20

单甲基酯壬二酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-苯丙氨酸



25

第 1 步: 苯丙氨酸缩乙二醇

30

按照制备亮氨酸缩乙二醇(方法 F, 实施例 12)所用的同样的步骤, 将 CBZ-Phe-OH(6.0g, 2mmol)转化成苯丙氨酸缩乙二醇。

第 2 步: Fmoc-Arg(NO₂)-OH

35

向苄基甲基氧羰基-N-羟基丁二酰亚氨基酯(32mmol)的 THF(60ml)溶液中加入搅拌过的 N^ε-硝基-L-精氨酸(35mmol) 和 NaHCO₃(70mmol)的水(70ml)溶液。1 小时后, 该乳白色溶液变得澄清, 用固体柠檬酸

化该溶液,使其 pH 为 2-3,并用 300ml EtOAc 萃取。有机层用水洗涤一次,并蒸发,得到白色固体化合物(26.8mmol)。

第 3 步: Fmoc-Arg(NO₂)-树脂

5

将 9-芴基甲基氧羰基-N^ε-硝基-L-精氨酸(得自第 2 步, 26.8mmol)、BOP(30mmol)、HOBt(30mmol)和 NMM(55mmol)的 DMF(40ml)溶液与 10g PAC 树脂(连接到聚苯乙烯-1%二乙烯基苯的 α-甲基苯甲酰甲基接头,取代率为 0.97mmol/g,由 Bachem Bioscience, Inc., King of Prussia, PA 供给)混合,并搅拌 4 小时。将树脂过滤,用 DMF、DCM 和 MeOH 洗涤,并使之干燥,产生终产物 Fmoc-Arg(NO₂)-树脂(11.1g)。该树脂 Fmoc-Arg(NO₂)-树脂(11.1g)用含哌啶(30%)、DMF(35%)和甲苯(35%)的溶液处理,并搅拌 2.5 小时。将去掉 Fmoc 的树脂过滤出来,并相继地用 DCM/DMF(50:50)和 MeOH 洗涤,以得到产物(9.2g)。

10

15

第 4 步: MeOAz : Arg(NO₂)-树脂

将壬二酸单甲酯(MeOAz) (20mmol)加入到 Arg(NO₂)树脂(9.2g)、BOP(20 mmol)、HOBt(20mmol)和 NMM(pH 调节至 8)的搅拌过的浆糊中。过夜搅拌后,加入壬二酸单甲酯(10mmol)、BOP(10mmol)、HOBt(10mmol)和 NMM(20mmol)的混合物,并搅拌 24 小时。用 DMF、DCM 和甲醇洗涤该树脂,得到 10.56g 树脂。

20

25

第 5 步: 单甲酯壬二酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸

将第 4 步的产物(10.56g)在 100ml 的 67%DCM (30%) TFA 和 3%苯甲醚溶液中搅拌 5 小时。过滤该浆状物,蒸发掉溶剂,并用乙醚研制,得到该肽(1.11g,2.75mmol)。

30

第 6 步: 单甲酯壬二酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-苯丙氨酸缩乙二醇

按照方法 C(实施例 9),用 BOP(1.3mmol)、HOBt(1.3mmol)和 NMM(将 pH 调节至 8),将甲氧基壬二酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸(1mmol)与 L-苯丙氨酸缩乙二醇(1.3mmol)偶合,得到题述的肽(0.82mmol)。

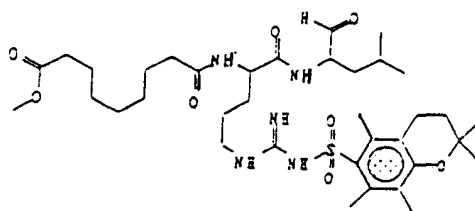
35

第7步: 单甲酯壬二酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-L-苯丙氨酸

采用方法 E(实施例 11), 将第 6 步制得的产物(0.82mmol)转化成题
述的化合物(0.81mmol). ¹H NMR(300MHz, DMSO-CDCl₃) δ: 9.59
5 (s, 1H), 8.36(s, 1H), 7.49(s, 1H), 7.31-7.09(m, 7H), 6.71(d,
1H), 4.69(m, 1H), 4.60(m, 1H), 3.66(s, 3H), 3.41(m, 2H),
3.27(m, 2H), 2.31(t, 2H), 2.2(t, 2H), 1.80-1.2(m, 14H).

实施例 28

10 单甲酯壬二酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-
精氨酸酰基-L-亮氨酸



15

第 1 步: 单甲酯壬二酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺
酰基)-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸缩乙二醇

20 按照方法 C(实施例 9), 用各 7.0mmol 的 BOP、HOBt 和 NMM,
将壬二酸单甲酯(1.42g, 7.0mmol)与 N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-
酰基)-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸缩乙二醇(3.06g, 5.0mmol, 得自实施例 20 的
第 2 步)偶合, 得到固态的该化合物(3.43g). ¹H NMR(300MHz, CDCl₃)
δ: 6.58(d, 1H), 6.04(d, 1H), 5.4(br, 1H), 5.06(br, 1H),
25 4.47(m, 1H), 4.30(d, 1H), 4.17(m, 1H), 3.67(s, 3H), 3.53(m,
4H), 3.23(d, 1H), 3.19(t, 2H), 2.30(m, 2H), 2.2(tt, 2H),
2.0-1.25(2 br m, 17H), 1.20(tt, 6H), 0.90(dd, 6H).

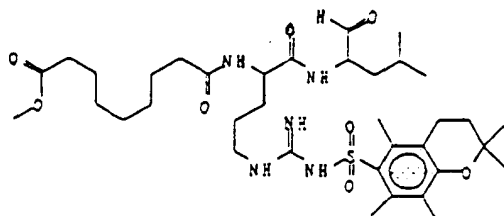
30 第 2 步: 单甲酯壬二酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺
酰基)-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸

采用方法 E(实施例 11), 将第 1 步制得的产物(0.30g)转化成化合物
28(0.22g). ¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.38(s, 1H), 8.5(br,
1H), 4.30(m, 1H), 4.09(m, 1H), 3.57(s, 3H), 3.15(m, 2H),
35 3.00(t, 2H), 2.75(m, 2H), 2.12(t, 2H), 1.8-1.20(2 br m, 17H),
0.86(dd, 6H)

实施例 29

单甲酯壬二酰基-N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-D-精氨酸基-L-亮氨酸

5



10

第 1 步: 9-苄基甲氧羰基-N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-D-精氨酸基-L-亮氨酸缩乙二醇

15

按照方法 C(实施例 9), 用溶在 5ml DMF 中的 BOP(3mmol)、HOBT(3mmol)和 NMM(5mmol), 将 9-苄基甲氧羰基-N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-D-精氨酸(3mmol)与亮氨酸缩乙二醇(2.5mmol)偶合, 得到固态的该肽(1.72g, 2mmol)。

20

第 2 步: MeOAz-D-Arg(PMC)-亮氨酸缩乙二醇

25

采用方法 C(实施例 9), 用溶在 5ml DMF 中的 BOP(1mmol)、HOBT(1mmol)和 NMM(3mmol), 将壬二酸单甲酯(1.0mmol)与 N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-D-精氨酸基-L-亮氨酸缩乙二醇(0.54g, 0.88mmol, 得自按照方法 B(实施例 18)的第 1 步产物)偶合, 得到该产物(0.735g)。

30

第 3 步: 单甲酯壬二酰基-N^s-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-D-精氨酸基-L-亮氨酸

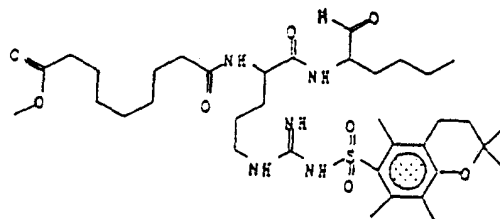
35

采用方法 E(实施例 11), 将第 2 步制得的产物(0.1g)转化成化合物 29, 并以 HPLC 纯化之。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 9.49(s, 1H), 7.74(t, 1H), 7.43(d, 1H), 6.43(d, 1H), 6.43(s, 2H), 4.60(m, 1H), 4.51(s, 3H), 4.54(s, 3H), 4.37(m, 1H), 3.66(s, 3H), 3.31(m, 2H), 2.63(t, 2H), 2.26(m, 4H), 2.09(s, 3H), 1.80(t, 2H), 1.57(m, 7H), 1.26(m, 16H), 0.90(dd, 6H)。

实施例 30

单甲酯基壬二酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-正亮氨酸

5



10

第 1 步: Fmoc-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-正亮氨酸

15

按照方法 C(实施例 9), 用溶在 6ml DMF 中的 BOP(2mmol)、HOBt(2mmol)和 NMM(6mmol), 将 Fmoc-Arg(PMC)-OH(2mmol)与正亮氨酸缩二乙醇(2mmol,按照制备 Leu-乙缩醛的步骤, 从 CBZ-Nle-OH 制得)偶合, 得到该肽(1.37g, 1.64mmol)。

第 2 步: MeOAz-Arg(PMC)-L-正亮氨酸缩二乙醇

20

按照方法 C(实施例 9), 用 BOP(2mmol)、HOBt(2mmol)和 NMM(6mmol), 将壬二酸单甲酯(2mmol)与 Arg(PMC)-正亮氨酸缩二乙醇(1.39mmol, 得自按照方法 B(实施例 8)的第 1 步)偶合, 并搅拌过夜。第二天, 加入各 1mmol 的壬二酸单甲酯、BOP、HOBt 和 NMM, 并搅拌 4 小时。如同方法 C(实施例 9)如述, 对反应混合物进行处理, 得到该肽(0.37g, 0.84mmol)。

25

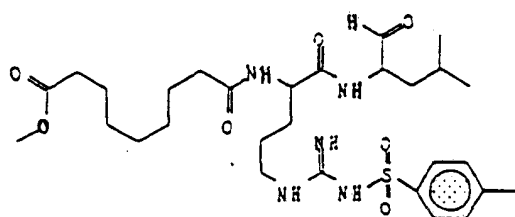
30

第 3 步: 按照方法 E(实施例 11), 将第 2 步制得的产物(0.94g, 0.84mmol)转化成化合物 30(0.58g) ¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 9.54(s, 1H), 7.49(t, 1H), 6.74(d, 1H), 6.26(s, 2H), 6.23(d, 1H), 4.58(m, 1H), 4.31(m, 1H), 3.66(s, 3H), 3.34(m, 2H), 2.63(t, 2H), 2.58(s, 3H), 2.56(s, 3H), 2.29(t, 2H), 2.23(t, 2H), 1.9-1.5(m, 22H), 1.30(s, 6H), 0.86(t, 3H)。

实施例 31

单甲酯壬二酰基-N^ε-(对甲苯磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

35



5

第1步: Fmoc-N^ε-(对甲苯磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇

采用方法 C(实施例 9), 用溶在 15ml DMF 中的 HBTU(5.5mmol)、
 HOBT(5.5mmol)和 NMM(11mmol), 将 Fmoc-N^ε-(对甲苯磺酰基)-L-精氨酸
 10 酸(5mmol)与亮氨酸缩二乙醇(5.5mmol)偶合。分离出的该肽为固体
 (2.86g,3.96mmol)。

第2步: 单甲酯壬二酰基-N^ε-(对甲苯磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸
 缩二乙醇

15

按照方法 C(实施例 9), 用溶在 15ml DMF 中的六氟磷酸 1-苯并三
 唑-1-基-1,1,3,3-四甲基脲 翁(tetramethyluronium)(HBTU)(6mmol)、HO
 Bt(6mmol)和 NMM(12mmol), 将壬二酸单甲酯(6mmol)与 N^ε-(对甲苯磺
 酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇(2.7g,4.7mmol,采用方法 B(实施例 8)
 20 的第1步制得)偶合并搅拌过夜。加入壬二酸单甲酯(3mmol)和二苯基磷
 酰基叠氮化物(3mmol)以增加反应的产率, 并搅拌 4 小时, 得到固体的
 该肽(1.92g)。

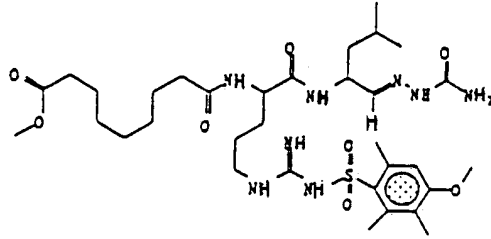
第3步: 单甲酯壬二酰基-N^ε-(对甲苯磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

25

根据方法 E(实施例 11), 第2步制得的产物(1.92g,2.8mmol)转化成
 化合物 31(1.64g)。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.37(s, 1H),
 8.97(d, 1H), 8.37(d, 1H), 7.66(d, 2H), 7.37(m, 1H), 7.29(d,
 2H), 7.03(s, 1H), 6.63(s, 1H), 4.09(m, 1H), 3.57(s, 3H),
 30 3.44(m, 1H), 3.04(m, 2H), 2.26(s, 3H), 2.33(t, 2H), 2.13(t,
 2H), 2.80-1.09(m, 7H), 0.86(dd, 6H)。

实施例 32

单甲酯壬二酰基-N^ε-(4-甲氧基-2,3,6-三甲苯基-1-磺酰基)-L-精氨酸
 35 基-L-亮氨酸缩氨基脲



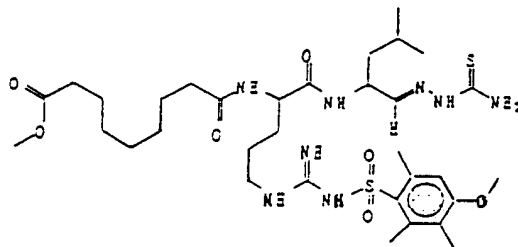
5 参见 Basak,A.等, Int. J. Peptide Protein Res.(国际肽、蛋白质研究杂志), 36,7-17(1990)。将溶在 3ml 95%乙醇中的 MeOAz-Arg(MTR)-Leu-H(实施例 34)(67mg,0.10mmol)、氢氯酸氨基脒(11mg,0.1mmol)和乙酸钠(9mg,0.11mmol)的混合物加热到 70 °C, 维持 18 小时。将反应混合物浓缩, 得到淡黄色固体(化合物 32), 如表 6 所示, 然后以 HPLC 对该固体产物进行纯化。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 7.91(t, 1H), 7.09(d, 1H), 6.68(s, 1H), 6.22(s, 1H), 4.37-4.46(m, 1H), 4.2-4.3(m, 1H), 4.04(d, 1H), 3.7(s, 3H), 3.58(s, 3H), 2.6(s, 3H), 2.27(dd, 2H), 2.05, 2.12(s, 3H), 1.2-1.64(m, 12H), 0.85(t, 6H)。

15

实施例 33

单甲酯壬二酰基-N^S-(4-甲氧基-2,3,6-三甲苯基-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩氨基硫脒

20



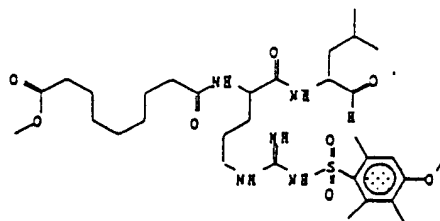
25

按照与实例 32 相同的步骤, 用溶在 2ml 90%乙醇中的化合物 34(51mg,0.07mmol)和缩氨基硫脒(7mg,0.07mmol)制备化合物 33。

实施例 34

单甲酯壬二酰基-N^S-(4-甲氧基-2,3,6-三甲苯基-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

30



35

第 1 步: 按照方法 C(实施例 9), 用 9-苄基甲氧羰基-N^S-(4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯-1-磺酰基)-L-精氨酸和 L-亮氨酸缩二乙醇来制备 9-苄基-

甲氧羰基-N⁸-(4-甲氧基-2,3,6-三甲苯基-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇。

5 第2步：单甲酯壬二酰基-N⁸-(4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

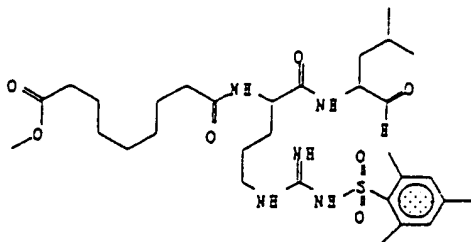
10 按照方法 C(实施例 9)，将壬二酸单甲酯(6mmol)与 N⁸-(4-甲氧基-2,5,6-三甲基苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇(5mmol,采用方法 B(实施例 8)自第 1 步制得)偶合，该肽以无定形的固体(3.3g)而被分离出来。

第3步：甲氧基壬二酰基-N⁸-(4-甲氧基-2,3,6-三甲基苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

15 按照方法 E(实施例 11)，将第 2 步制得的产物(0.5g)转化成化合物 34。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 9.54(s, 1H), 7.51(s, 1H), 6.74(d, 1H), 6.57(s, 1H), 6.40(s, 2H), 6.31(s, 1H), 4.66(m, 1H), 4.41(m, 1H), 3.87(s, 3H), 3.70(s, 3H), 3.33(m, 2H), 2.73(s, 3H), 2.66(s, 3H), 2.33(t, 2H), 2.26(t, 2H), 2.17(s, 20 3H), 2.00-1.26(m, 17H), 0.96(dd, 6H)。

实施例 35

甲氧基壬二酰基-N⁸-(2,4,6-三甲基苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸



30 第1步：Fmoc-N⁸-(2,4,6-三甲基苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇

35 将 4M HCl 的二恶烷(10ml)溶液加入到 BOC-Arg(MTS)-OH(6mmol)的二恶烷(10ml)溶液中。30 分钟后，除去溶剂，并加入乙醚，收集沉淀并使之干燥(3.21g,9mmol)。按照制备甲苯磺酰基衍生物(实施例 31)所述的

步骤, 将氢氯酸 Arg-MTS-OH 转化为 Fmoc-Arg(MTS)-OH, 得到白色固态的题述化合物(2.09g).

第 2 步: Fmoc-Arg(MTS)-Leu-乙缩醛

5 按照方法 C(实例 9), 用溶在 15ml DMF 中的 HBTU(4mmol)、HOBt(4mmol)和 NMM(10mmol), 将 Fmoc-Arg(MTS)-OH(3.361mmol)与亮氨酸缩二乙醇(4mmol)偶合, 得到题述的肽(1.05g).

第 3 步: MeOAz-Arg(MTS)-Leu-乙缩醛

10

采用方法 C, 用溶在 3ml DMF 中的 BOP(1.2mmol)、HOBt(1.2mmol)和 NMM(3.6mmol), 将壬二酸单甲酯(1.2mmol)与 Arg(MTS)-Leu-乙缩醛(0.85mmol, 按照方法 B(实施例 8)自第 2 步制得)偶合, 并过夜搅拌, 得到半固体的题述肽(0.59g).

15

第 4 步: 甲氧基壬二酰基-N^ε-(2,4,6-三甲基苯-1-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

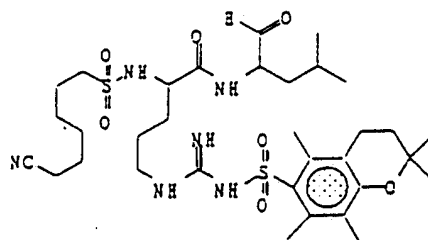
20 根据方法 E(实施例 11), 将第 3 步的产物(0.59g)转化成化合物 35(0.54g), 并以 HPLC 纯化之。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 9.49(s, 1H), 7.53(s, 1H), 6.90(s, 2H), 6.81(d, 1H), 6.40(bs, 3H), 4.61(m, 1H), 4.38(m, 1H), 3.67(s, 3H), 2.67(s, 6H), 2.29(t, 2H), 2.20(t, 2H), 2.0-1.20(m, 19H), 0.91(dd, 6H)

25

实施例 36

6-氰基-己烷-1-磺酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

30



第 1 步: 6-氰基-己烷-1-磺酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇

35

将方法 G(实施例 13)中的第 14 步制得的 6-氰基-己烷-1-磺酰氯(0.19

g,0.89mmol)加入到实施例 20 的第 2 步制得的产物(0.55g,0.899mmol)的 DMF(1ml)溶液中,并用 NMM 将溶液的 pH 调节至 8。搅拌 4 个小时后,按方法 A(实例 7)所述对反应混合物进行处理,以得到题述的化合物(0.466g)。

5

第 2 步: 6-氰基-己烷-1-磺酰基-N^ε-(2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基)-L-精氨酸基-L-亮氨酸

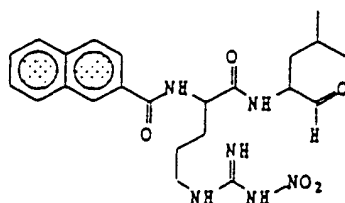
采用方法 E(实施例 11),将第 1 步制得的产物转化成化合物 36(0.22g),并如表 6 所示,以 HPLC 纯化之。¹H NMR(300MHz, DMSO-d₆) δ: 9.37(s, 1H), 6.83(b, 1H), 6.43(b, 1H), 3.88(m, 1H), 3.77(m, 1H), 3.01(m, 2H), 2.80(m, 2H), 2.55(t, 2H), 2.46(s, 6H), 2.0(s, 3H), 1.75(m, 5H), 1.6-1.3(m, 15H), 1.23(s, 6H), 0.84(dd, 6H)

15

实施例 37

2-萘甲酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸

20



25

第 1 步: 2-萘甲酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇

30

将 2-萘甲酰氯(0.104g,0.55mmol)加入到实施例 14 的第 2 步所制得的产物的 DMF(2ml)和 NMM(0.18ml)的溶液中,得到固态的题述化合物(0.22g)。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 8.92(b, 1H), 8.0-7.91(m, 10H), 6.93(d, 1H), 5.07(m, 1H), 4.37(d, 1H), 4.17(m, 1H), 3.69(m, 3H), 3.53(m, 3H), 3.38(m, 2H), 1.77, 1.58, 1.4(m, 5H), 0.83(dd, 6H)。

35

第 2 步: 2-萘甲酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸

采用方法 E(实施例 11),将第 1 步制得的产物(0.1g)转化成化合物

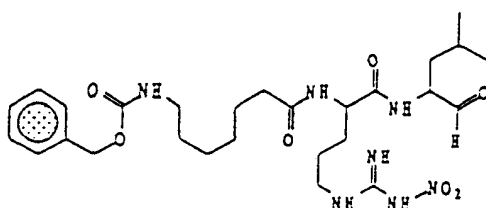
37(60mg). $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ : 9.43(s, 1H), 8.72(d, 1H), 8.53(m, 2H), 8.0(m, 6H), 7.6(m, 2H), 6.20(m, 1H), 4.57(m, 1H), 4.14(m, 1H), 3.92(m, 1H), 3.2(m, 2H), 3.0(d, 1H), 1.77(m, 5H), 0.86(m, 6H).

5

实施例 38

CBZ-7-氨基庚酰基- N^{S} -硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸

10



15

第 1 步: CBZ-7-氨基庚酰基- N^{S} -硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸缩二乙醇

20

按照方法 C(实施例 9), 用 BOP(1.1g,2.5mmol)、HOBT(0.34g,2.5mmol)和 NMM(0.253ml,2.5mmol), 将 CBZ-7-氨基庚酸(0.7g,2.5mmol)与实施例 14 的第 2 步产物(0.78g,2.0mmol)偶合, 得到半固体状的肽, 该肽直接用于下一步骤。

第 2 步: CBZ-7-氨基庚酰基- N^{S} -硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸

25

按照方法 E(实施例 11), 在搅拌反应混合物 5 小时后, 将第 1 步制得的乙缩醛转化成化合物 38(0.8g). $^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6) δ : 9.30(s, 1H), 8.47(s, 1H), 8.46(s, 1H), 8.29(d, 1H), 8.11(t, 1H), 7.80(s, 1H), 7.64(d, 1H), 7.31(s, 1H), 7.23(s, 5H), 4.91(s, 2H), 4.23(m, 1H), 4.00(m, 1H), 3.51(q, 2H), 3.27(m, 2H), 2.89(q, 2H), 2.11(t, 2H), 2.03(t, 2H), 1.7-1.00(m, 10H), 0.77(dd, 6H).

30

实施例 39-42 描述了列于表 7 中的 MCP 抑制剂的合成。

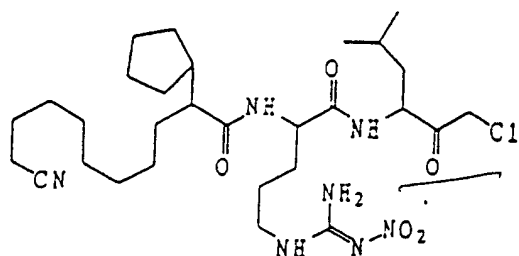
表 7

实施例编号	抑制率(%) (1 μm)	IC_{50}nM
-------	------------------------------	---------------------------

39(异构体 a)	31	>1000
39(异构体 b)	21	>1000
40	100	8
41(异构体 a)	99	22
41(异构体 b)	98	13
42	15	>1000

实施例 39

10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸甲基酮



在本实例以及下文的三个实施例中，本发明的抑制剂均通过第 II 偶合方法制备。在各实施例中，如此处所述，将制备的 10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸偶合到有酶活性的氨基酸衍生物上，来产生抑制剂。得到的这些抑制剂是两个或多个非对映异构体的混合物，在某些情况下，这些非对映异构体可以通过 HPLC 来分离。

A) 10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸甲酯

按照方法 C(实施例 9)的步骤，将得自实例 13 第 5 步的 10-氰基-2-环戊基-癸酸(2.4g;11mmol)与二盐酸-N^ε-硝基-L-精氨酸甲酯(2.86g,11 mmol)、BOP(6.6g,15mmol)、HOBT(1.62g,12mmol)和 3.6ml 的 NMM (33mmol)一起搅拌，得到泡沫样固体，4.8g 的甲基酯。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 8.75(bs, 1H), 7.81(bs, 2H), 6.42(d, 1H), 4.67(t, 1H), 3.82(s, 3H), 3.75(m, 1H), 3.32(m, 1H), 2.15(t, 2H), 2.05-1.12(m, 28H)。

B) 10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸

将“ A ”步制得的甲基酯 5.5g 溶在 30ml 的甲醇中，用 1.00N 的氢

氧化钠水溶液处理该溶液。2小时后，加入2%的碳酸氢钠水溶液100ml，所得的溶液用100ml的乙醚萃取。分离出水层，以3%的柠檬酸水溶液酸化，并用250ml的乙酸乙酯萃取。分离出所得的有机层，以无水MgSO₄干燥，蒸发，得到无色的胶状物，用石油醚研制固化物，得到4.4g白色的极细粉末。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 10.6(bs, 1H), 8.75(bs, 1H), 7.82(bs, 2H), 6.41(d, 1H), 4.67(t, 1H), 3.71(m, 1H), 3.32(m, 1H), 2.15(t, 2H), 2.04-1.12(m, 30H).

C)10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸甲基酮

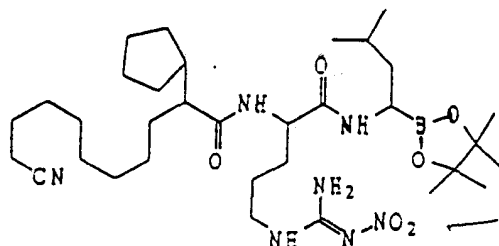
用0.33ml(3mmol)的NMM处理上文“B”步的产物467mg(1.0mmol)和270mg 氢氯酸亮氨酸甲基酮(Bachem Biosciences, Inc., King of Prussia, Pennsylvania)、440mg(1.0mmol)的BOP以及(135mg (1mmol)的HOBt的混合物(溶在4.0ml的DMF中)。4小时后，该混合物以75ml的乙酸乙酯稀释，用2%的NaHCO₃水溶液、水、3%的柠檬酸水溶液洗涤，最后再用水洗涤一次。分离有机层，以MgSO₄干燥，最后蒸发，得到淡黄色的粘稠的油。采用快速色谱法，用乙酸乙酯洗脱，使该化合物通过9 × 1/2英寸的硅胶60-H柱而纯化之。蒸发所得的溶液，得到无色的胶状物，用1:1的乙酸乙酯/乙醚使该胶状物固化，得到198mg的无色固体氯甲基酮。HPLC表明有两个非对映异构体存在，以制备性RP-HPLC分离该两个异构体。在水-乙腈溶剂梯度(30-80%的乙腈，40分钟内)中，在22.58分钟(非对映异构体a)和23.7分钟(非对映异构体b)时分离出洗脱峰。

非对映异构体a: ¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 8.53(bs, 1H), 7.61(bs, 2H), 7.31(bs, 1H), 6.69(d, 1H), 4.73(m, 1H), 4.65(m, 1H), 4.28(q, 2H), 3.53(m, 1H), 3.31(t, 1H), 2.32(t, 2H), 1.90-1.11(m, 31H), 0.93(q, 6H).

非对映异构体b: ¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 8.53(bs, 1H), 7.61(bs, 2H), 7.31(bs, 1H), 6.79(d, 1H), 4.73(m, 1H), 4.65(m, 1H), 4.28(q, 2H), 3.53(m, 1H), 3.31(t, 1H), 2.32(t, 2H), 1.90-1.11(m, 31H), 0.93(q, 6H).

实施例 40

10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-亮氨酸硼酸频哪醇酯



5

将 467mg(1.0ml)的 10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸(上文的实施例 39, “B”步)、由 Shenvi 的美国专利 4,577,773 方法制备的 264mg(1.0mmol)的氢氰酸亮氨酸硼酸频哪醇酯、4.40mg(1.0mmol)的 BOP 和 135mg(1.0mmol)的 HOBt 溶在 5.0ml 的 DMF 中, 该溶液用 0.33ml(3mmol)的 NMM 处理。2 小时后, 该混合物用 75ml 的乙酸乙酯稀释, 用 2%的 NaHCO₃ 水溶液和水洗涤, 分离有机层, 以 MgSO₄ 干燥并蒸发, 得到 410mg 的浅棕色粉末。该固体用氯仿洗涤, 得到 290mg 白色的固体产物, 该产物在 HPLC 中表现为单一的峰。¹H NMR(300 MHz, CDCl₃) δ: 8.53(bs, 1H), 7.65(bs, 2H), 6.71(t, 1H), 4.61(m, 1H), 3.52(m, 1H), 3.31(m, 2H), 3.05(m, 1H), 2.82(m, 1H), 2.38(t, 2H), 2.06-1.42(m, 28H), 1.22(s, 12H), 1.15(m, 2H), 0.92(m, 6H)。

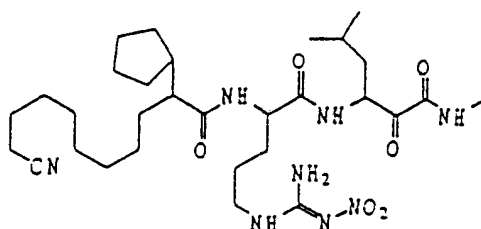
10

15

实施例 41

20

10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-L-亮氨酸 α-酮乙酰胺



25

30

A)10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸酰基-(1-乙基氨基羰基-1-羟基-4-甲基)-2-戊酰胺

35

467mg(1.0mmol)的 10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸和 225mg 氢氯酸 3-氨基-2-羟基-5-甲基-己酸 N-乙酰胺(由 Harbeson 等在 J. Med. Chem.37,2918-29(1994)中公开的方法制备)的 DMF(5.0ml)溶液用 440mg(1mmol)的 BOP、135mg(1mmol)的 HOBt 和 0.33ml(3mmol)的 NMM 处理。搅拌 2 小时后, 该溶液用 75ml 的乙酸乙酯稀释, 并用 2%的 NaHCO₃ 水溶液、水、3%的柠檬酸水溶液、水洗涤, 以 MgSO₄ 干燥,

蒸发后得到 540mg 浅白色的固体羟基化合物。 $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 8.53(bs, 1H), 7.73(bs, 2H), 7.04(bs, 1H), 6.83(t, 1H), 4.52(m, 1H), 4.19(m, 1H), 4.11(q, 2H), 3.46(q, 2H), 3.26(m, 2H), 2.35(t, 2H), 1.91(m, 2H), 1.83(m, 2H), 1.8-1.2(m, 28H), 1.13(t, 3H), 0.88(m, 6H).

B)10-氰基-2-环戊基-癸酰基- N^8 -硝基-L-精氨酸基-L-亮氨酸 α -酮乙酰胺

10 将上文“ A ”制得的羟基化合物 250mg 溶在 6.0ml 的无水二氯甲烷中, 将该溶液冷却到 0 °C, 并将之与 225mg 约(0.5mmol)的 Dess-Martin 试剂(D.B.Dess 和 J. C. Martin, *J. Org. Chem*(有机化学杂志)48, 4156-4158(1983))一起搅拌。

15 使该反应混合物温热到室温, 并搅拌 2 小时。以 50ml 的乙酸乙酯稀释该混浊的悬浮液, 并使之过滤通过精细烧结的玻璃滤器。滤液先用 10%的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 水溶液洗涤, 然后再用饱和的 NaCl 洗涤。以 MgSO_4 干燥, 并使之蒸发, 得到 180mg 白色固态的酮酰胺产物。采用水-乙腈梯度系统(40-70%乙腈, 40 分钟), 以制备性的 RP-HPLC 纯化该产物。在 20 18.07 分钟(非对映异构体 a)和 19.54 分钟(非对映异构体 b)收集到吸收峰。

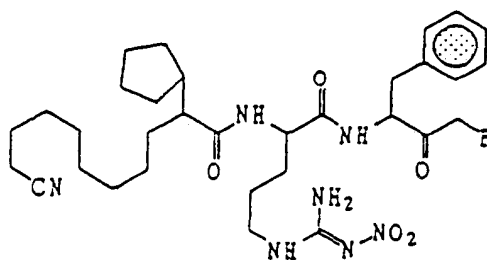
25 非对映异构体 a: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 8.45(bs, 1H), 7.58(bs, 2H), 7.04(bm, 2H), 6.57(t, 1H), 5.33(t, 1H), 4.60(m, 1H), 3.51(m, 1H), 3.33(m, 3H), 2.35(t, 2H), 1.91-1.11(m, 34H), 0.94(m, 6H).

30 非对映异构体 b: $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 8.45(bs, 1H), 7.48(bs, 2H), 7.25(m, 1H), 7.04(t, 1H), 6.85(m, 1H), 6, 62(d, 1H), 5, 32(t, 1H), 4.81(m, 1H), 4.58(m, 1H), 3.51(m, 1H), 3.35(m, 3H), 2.35(t, 2H), 1.95-1.11(m, 32H), 0.98(m, 6H).

实施例 42

35 10-氰基-2-环戊基-癸酰基- N^8 -硝基-L-精氨酸基-苯丙氨酸)氟甲基酮

5



10

A)1-硝基-2-苯基乙烷的合成

在 45 分钟内,于室温,边搅拌边向反式- β -苯乙烯(5.25g,0.035mol)和硅胶(10g,230-400 筛目)的混合物(溶在 400ml 氯仿和 75ml 的异丙醇中)中,慢慢地加入氢硼化钠(5.50g,0.145mol)。对该反应物再搅拌 15 分钟,然后小心地加入 10%的盐酸(20ml)而使反应终止。过滤并用氯仿(50ml)

15 洗涤分离出的固体。合并滤液,以水(1 \times 20ml)、盐水(1 \times 20ml)洗涤,并用无水硫酸钠干燥。在减压下蒸发溶剂,得到粗产物,以快速色谱(硅胶,8%乙酸乙酯-己烷)纯化该粗产物,得到无色油状有辛辣气味的 1-硝基-2-苯基乙烷 2.86g; R_f (10%乙酸乙酯的己烷溶液):0.40; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) 7.40-7.20(m, 5H), 4.60(t, 2H), 3.30(t, 2H)。

20

B)1-氟-2-羟基-3-硝基-4-苯基丁烷的合成

向冷的(-78 $^{\circ}C$)2M 草酰氯的二氯甲烷(11.60ml,0.0232mol)溶液中缓慢地加入二甲亚砜(3.65g,3.32ml,0.0467mol)。搅拌该反应混合物 15 分钟。然后将 2-氟乙醇(1.16g,0.0181mol)的二氯甲烷(10ml)溶液慢慢地加入到反应烧瓶中。继续搅拌 15 分钟后,以无水二氯甲烷(180 ml)稀释该反应混合物,并向其中加入三乙胺(9.20g,12.63ml,0.090 mol)。继续搅拌 2 小时,此时温度已升至室温。此时,将 1-硝基-2-苯基乙烷(2.74g,0.0181 mol)的无水二氯甲烷(10 ml)溶液加入到该反应混合物中,继续搅拌过液。然后,

30 用水(1 \times 30 ml)、4%盐酸(3 \times 20 ml)、水(1 \times 20 ml)、饱和的碳酸氢钠溶液(2 \times 20 ml)和盐水(1 \times 20ml)洗涤该混合物。以无水硫酸钠干燥,使溶剂蒸发掉,得到粗产物。以快速色谱法(硅胶,25%乙酸乙酯-己烷)纯化,得到叠同(erythro)异构体和对映(threo)异构体的产物。总产率为 3.01 g。该过程的总体性描述可在 Imperiali, B.等, *Tetrahedron Lett.*(四面体通信)27(2),135(1986)和 Revesz,L.等, *Tetrahedron Lett.*(四面体通信)35(52), 9693(1994)中找到。

35

异构体 a 为白色固体, mp 71-73 °C; R_f (30%乙酸乙酯的己烷溶液): 0.46; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 7.40-7.10(m, 5H), 4.90(m, 1H), 4.60(m, 1H), 4.50-4.30(m, 2H), 3.45-3.25(m, 2H), 2.70(d, 1H).

异构体 b 为无色的油, R_f (30%乙酸乙酯的己烷溶液): 0.42; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ : 7.40-7.15(m, 5H), 4.90(m, 1H), 4.65(m, 1H), 4.50(m, 1H), 4.20(m, 1H), 3.40-3.30(m, 2H), 2.90(d, 1H).

C) 3-氨基-1-氟-2-羟基-4-苯基丁烷的合成

使上述异构体 a(0.48g, 2.25mmol)、绝对乙醇(20ml)和兰尼镍(催化量)的混合物在 Parr 仪器中氢化(60 磅/平方英寸)5 小时。通过硅藻土垫过滤并使溶剂蒸发, 得到 410mg 的胺异构体 a。对上述异构体 b(800mg, 3.75 mmol)做类似的处理, 得到了 510mg 的胺异构体 b。

胺异构体 a 是白色固体, mp 64-67 °C; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 7.40-7.10(m, 5H), 4.70(d, 1H), 4.50(d, 1H), 3.90-3.70(m, 1H), 3.30-3.10(m, 1H), 2.95(dd, 1H), 2.60-2.45(q, 1H), 2.20-1.70(宽峰, 3H).

胺异构体 b 是白色固体, mp 67-70 °C; $^1\text{H NMR}$ (300MHz, CDCl_3) δ 7.40-7.10(m, 5H), 4.70-(d, 1H), 4.55(d, 1H), 3.70-3.50(m, 1H), 3.20-3.00(m, 1H), 2.95(dd, 1H), 2.60-2.45(q, 1H), 2.20-1.65(宽峰, 3H).

D) 10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸基-(4-氟-3-羟基-1-苯基)-2-丁酰胺

用 440mg(1.0mmol)的 BOP、135mg(1.0mmol)的 HOBt 和 0.33ml(3mmol)的 NMM 处理溶于 5ml DMF 中的 10-氰基-2-环戊基-癸酰基-N^ε-硝基-L-精氨酸(467mg, 1.0mmol)和 3-氨基-1-氟-2-羟基-4-苯基-丁烷(183mg, 1.0mmol)的溶液。搅拌 2 小时后, 该溶液以 75ml 的乙酸乙酯稀释, 并以 2%的 NaHCO_3 水溶液、水、3%的柠檬酸水溶液、水洗涤, 以 MgSO_4 干燥, 蒸发后得到浅白色的固体状的羟基化合物 480mg。 $^1\text{H NMR}$ (300MHz, $\text{CDCl}_3+\text{d}_6\text{-DMSO}$) δ : 8.15(bs, 1H), 7.82(bs, 2H),

7.21(m, 6H), 5.05(t, 1H), 4.51(m, 1H), 4.22(m, 1H), 3.82(m, 1H), 3.75(m, 2H), 2.95(q, 2H), 2.35(t, 2H), 2.04-1.13(m, 31H).

5 E)10-氰基-2-环戊基-1-癸酰基-N⁸-硝基-L-精氨酸基-苯丙氨酸)氟甲基酮

10 将上文“C”步制得的羟基化合物 250mg 溶在 6.0ml 的无水二氯甲烷中, 将该溶液冷却到 0 °C, 并使之与 225mg(约 0.5mmol)的 Dess-Martin 试剂一起搅拌。使反应混合物温热到室温, 并搅拌 2 小时。用 50ml 乙酸乙酯稀释该混浊的悬浮液, 用精细烧结的玻璃滤器过滤。滤液用 10%的 Na₂S₂O₃ 洗涤, 然后用饱和 NaCl 洗涤。以 MgSO₄ 干燥之, 蒸发溶剂, 得到 180mg 的白色固体。HPLC 纯化后, 得到了 42mg 的纯氟甲基酮产物。¹H NMR(300MHz, CDCl₃) δ: 8.56(bs, 1H), 7.62(bs, 2H), 7.42(t, 1H), 7.21(m, 5H), 6.63(m, 1H), 5.05-4.53(m, 4H), 3.46(m, 1H), 3.18(m, 2H), 2.98(q, 2H), 2.33(t, 2H), 2.04-1.13(m, 27H).

20 将在本说明书中提到的各篇公开文献的全文内容引入本文作参考。

25 本领域的那些技术人员应认识到, 可对本发明的优选实施方案进行变化和修改, 而且可在不背离本发明精神的前提下完成这些变化和修改。因此, 所附的权利要求覆盖了落入本发明实质和范围内的所有等价的变化。

序列表

(1)一般信息:

- 5 (i)申请人: 穆罕默德·伊克巴尔
桑卡尔·查特吉
詹姆斯·L·迪博尔德
詹姆斯·C·考尔
罗伯特·西曼
- 10 (ii)发明名称: 多相催化蛋白酶的抑制剂
(iii)序列数: 10
(iv)通讯地址:
(A)收信人: Woodcock Washburn Kurtz Mackiewicz 和 Norris
(B)街道: One Liberty Place-46th Floor
15 (C)城市: 费城
(D)州: 宾西法尼亚州
(E)国家: 美国
(F)邮编: 19103
(v)计算机可读形式:
20 (A)介质类型: 3.5 英寸软盘, 720Kb
(B)计算机: IBM PC 兼容机
(C)操作系统: PC-DOS/MS-DOS
(D)软件: Word Perfect 5.1
(vi)本申请数据:
25 (A)申请号: 无
(B)申请日: 今日
(C)分类号: 无
(viii)代理人信息:
30 (A)姓名: 米歇尔·P·斯特拉赫
(B)登记号: 38, 325
(C)案卷/卷宗号: CEPH-0148
(ix)电讯信息:
(A)电话: 215-568-3100
(B)传真: 215-568-3439

35

(2)SEQ ID NO: 1 的信息

- 5 (i)序列特征:
(A)长度: 36 对碱基
(B)类型: 核酸
(C)链型: 单链
(D)拓扑学: 线性
(xi)序列描述: SEQ ID NO: 1:
TCGATCGAAG CTTGCCGCCA CCATGGCGAT GAAAGC 36
- 10 (2)SEQ ID NO: 2 的信息
(i)序列特征:
(A)长度: 30 对碱基
(B)类型: 核酸
(C)链型: 单链
(D)拓扑学: 线性
(xi)序列描述: SEQ ID NO: 2:
AGCTAGCCTC GAGCAGATTA CAGTTTAATG 30
- 15 (2)SEQ ID NO: 3 的信息
(i)序列特征:
(A)长度: 21 对碱基
(B)类型: 核酸
(C)链型: 单链
(D)拓扑学: 线性
(xi)序列描述: SEQ ID NO: 3:
25 TTAATCCTCA CTCTAAGAAA C 21
- 30 (2)SEQ ID NO: 4 的信息
(i)序列特征:
(A)长度: 24 对碱基
(B)类型: 核酸
(C)链型: 单链
(D)拓扑学: 线性
(xi)序列描述: SEQ ID NO: 4:
TTGTACGGCC AGTGATGGAA TGCT 24
- 35 (2)SEQ ID NO: 5 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 24 对碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑学: 线性

5

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 5:

AGCATTCCAT CACTGGCCGT ACAA 24

(2)SEQ ID NO: 6 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 20 对碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑学: 线性

10

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 6:

TAATACGACT CACTATAGGG 20

(2)SEQ ID NO: 7 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 41 对碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑学: 线性

20

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 7:

25

GCACACCACT TTCATCGCCA TGGTGGCGGC AAGCTTCGAT C 41

(2)SEQ ID NO: 8 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 20 对碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑学: 线性

30

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 8:

ATTAACCCTC ACTAAAGGGA 20

35

(2)SEQ ID NO: 9 的信息

(i)序列特征:

(A)长度: 41 对碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

5

(D)拓扑学: 线性

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 9:

GATCGAAGCT TGCCGCCACC ATGGCGATGA AAGTGGTGTG C 41

(2)SEQ ID NO: 10 的信息

10

(i)序列特征:

(A)长度: 18 对碱基

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑学: 线性

15

(xi)序列描述: SEQ ID NO: 10:

CTTCAGTTAA TCCTGTAA 18

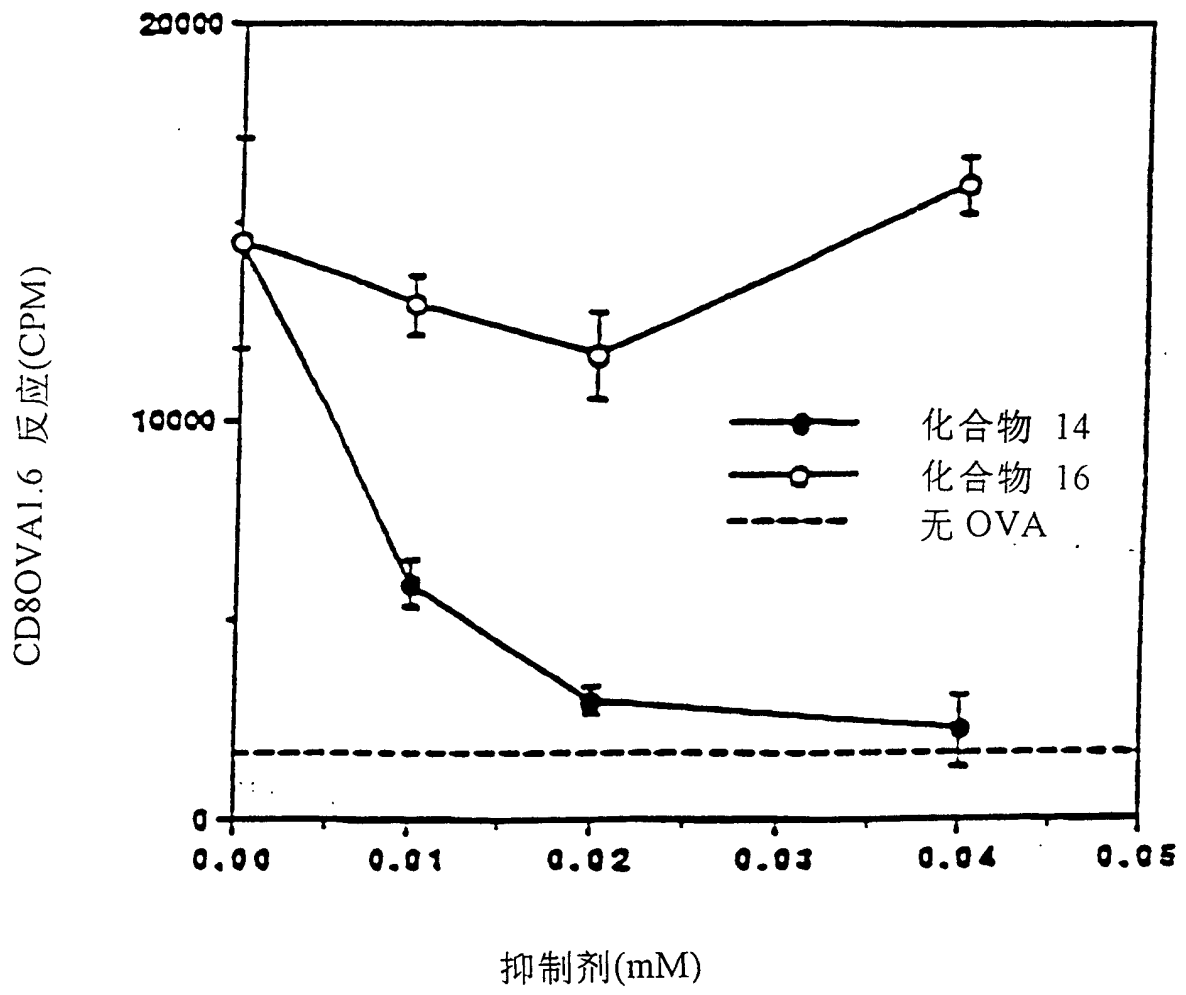


图 1

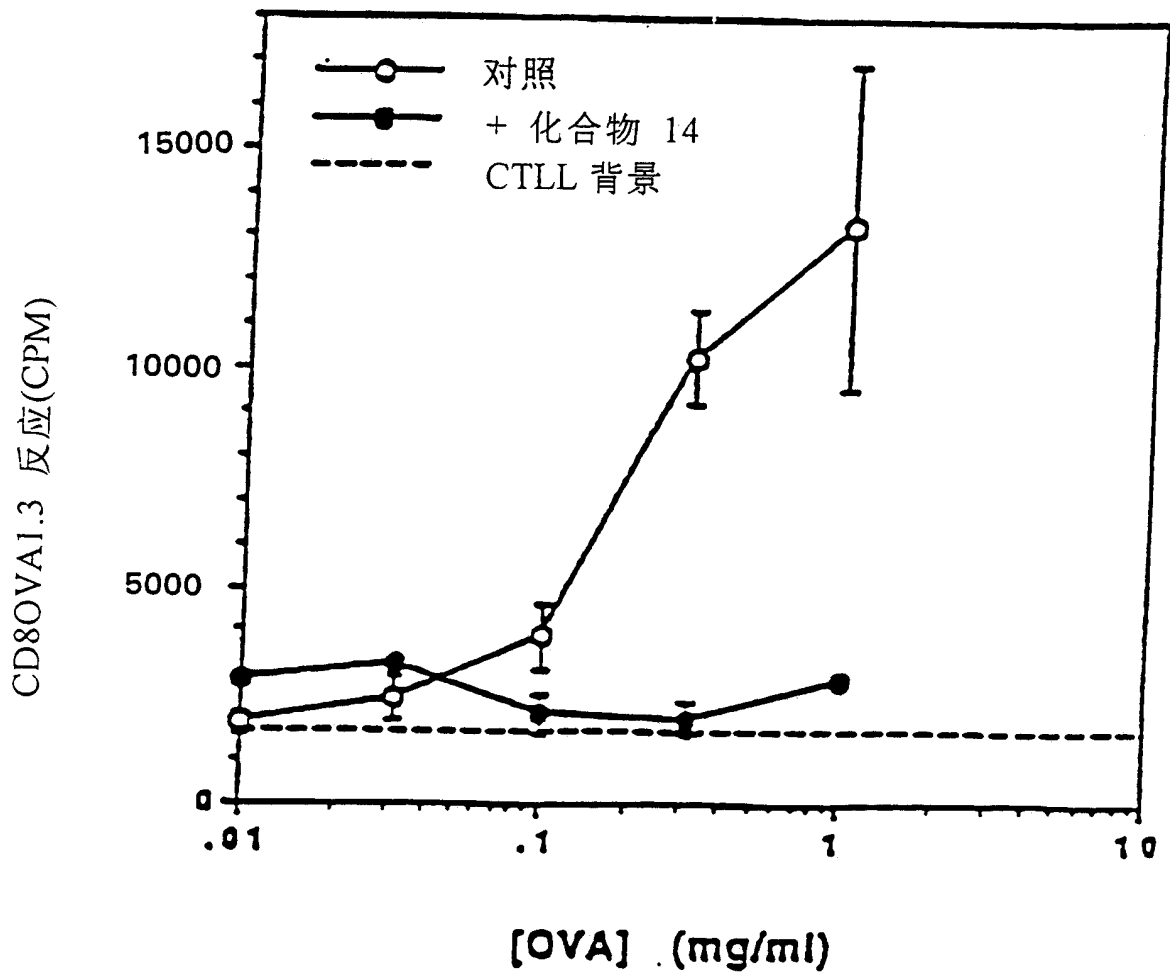


图 2

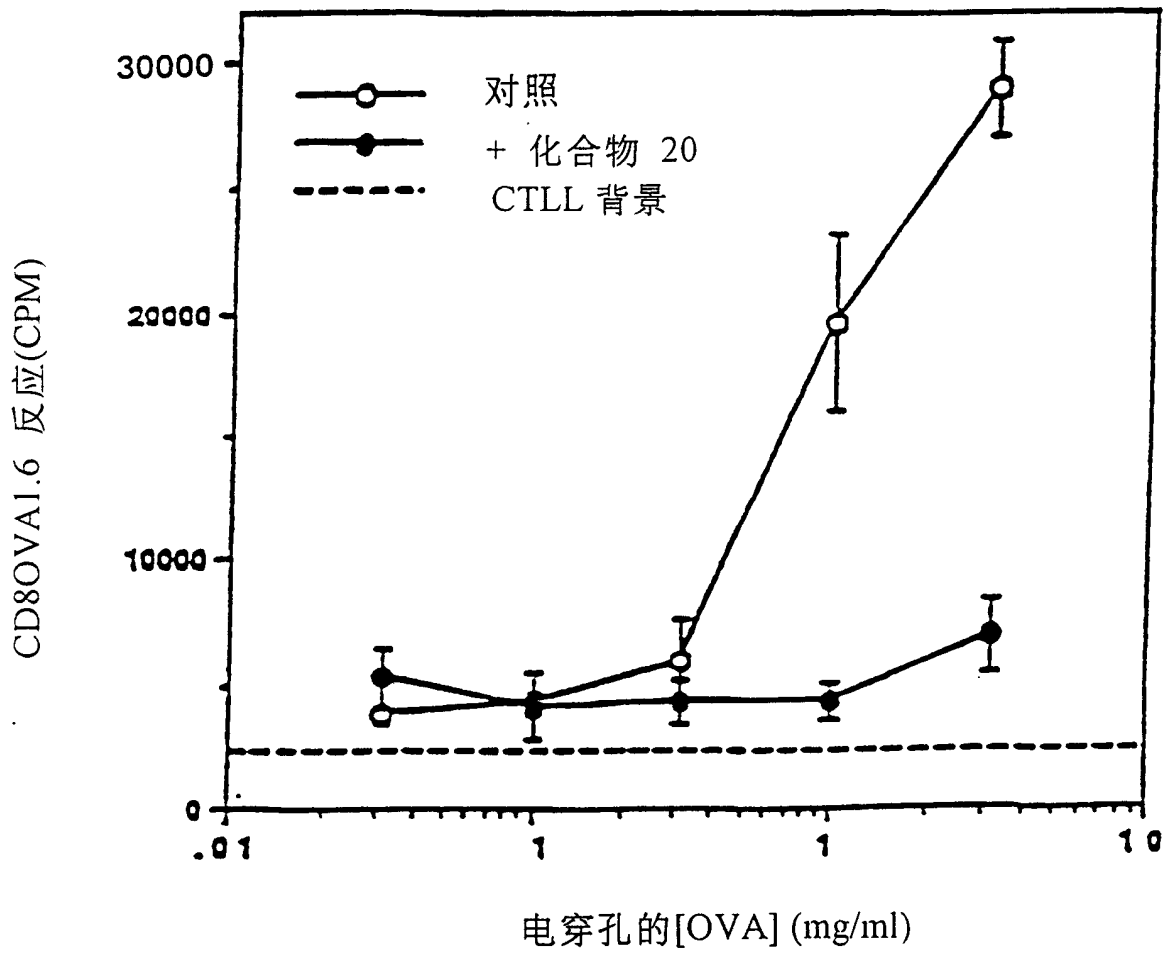


图 3

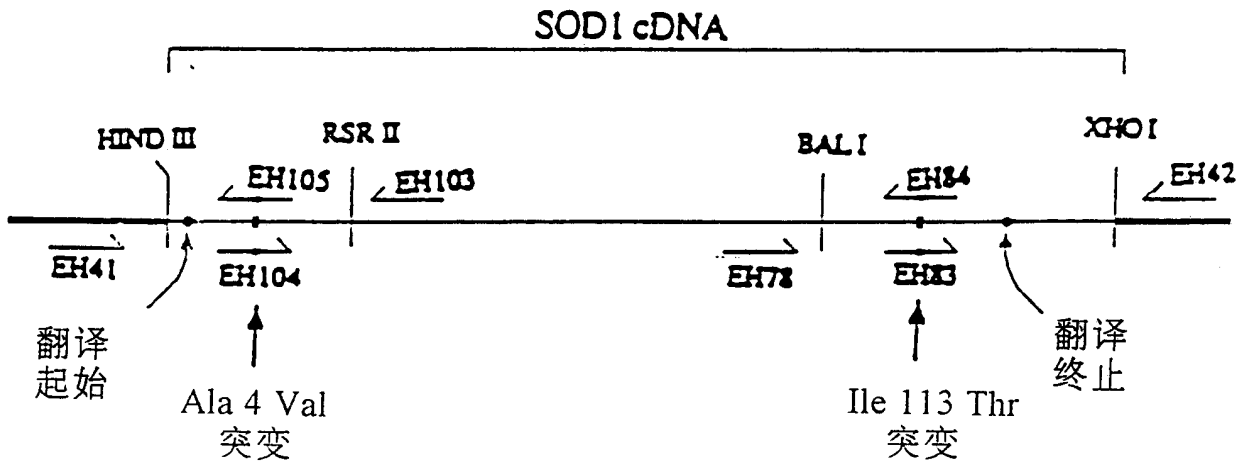


图 4

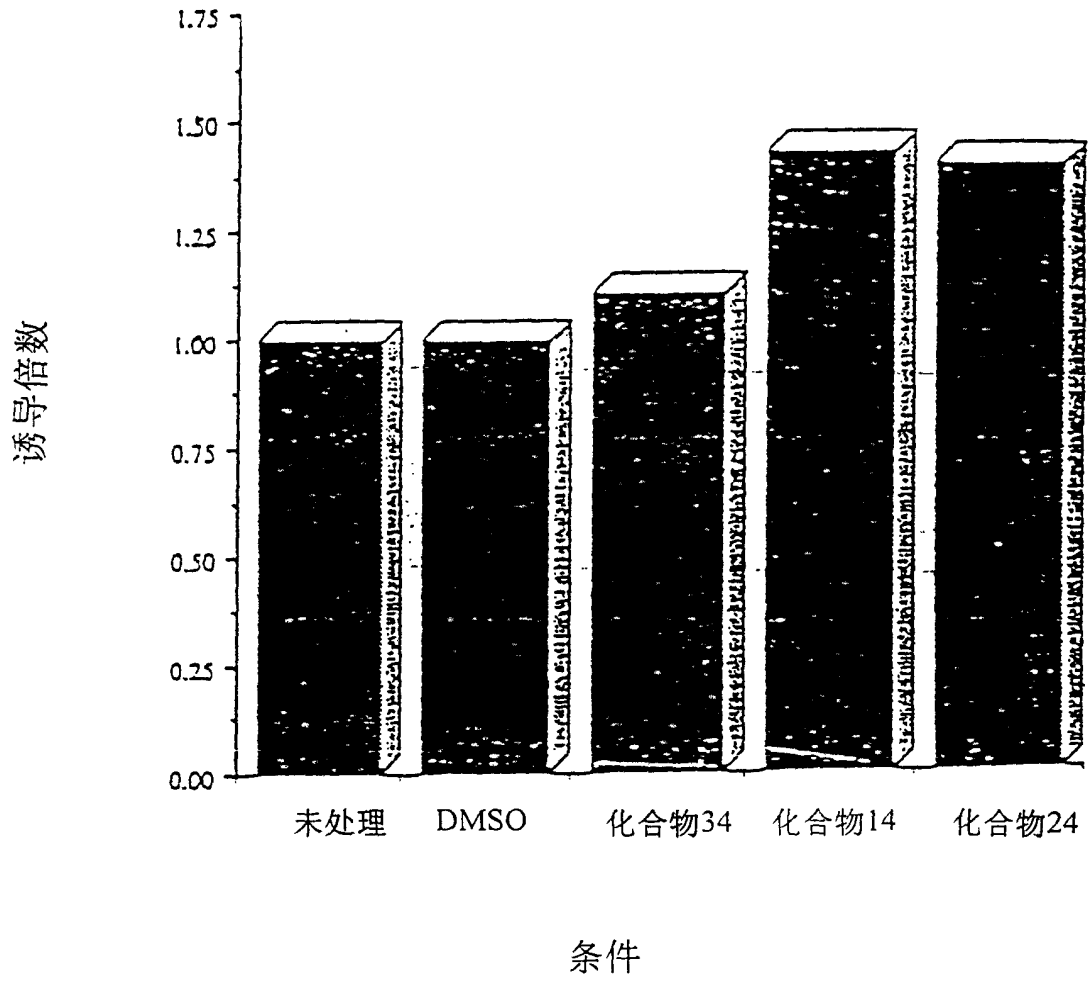


图 5

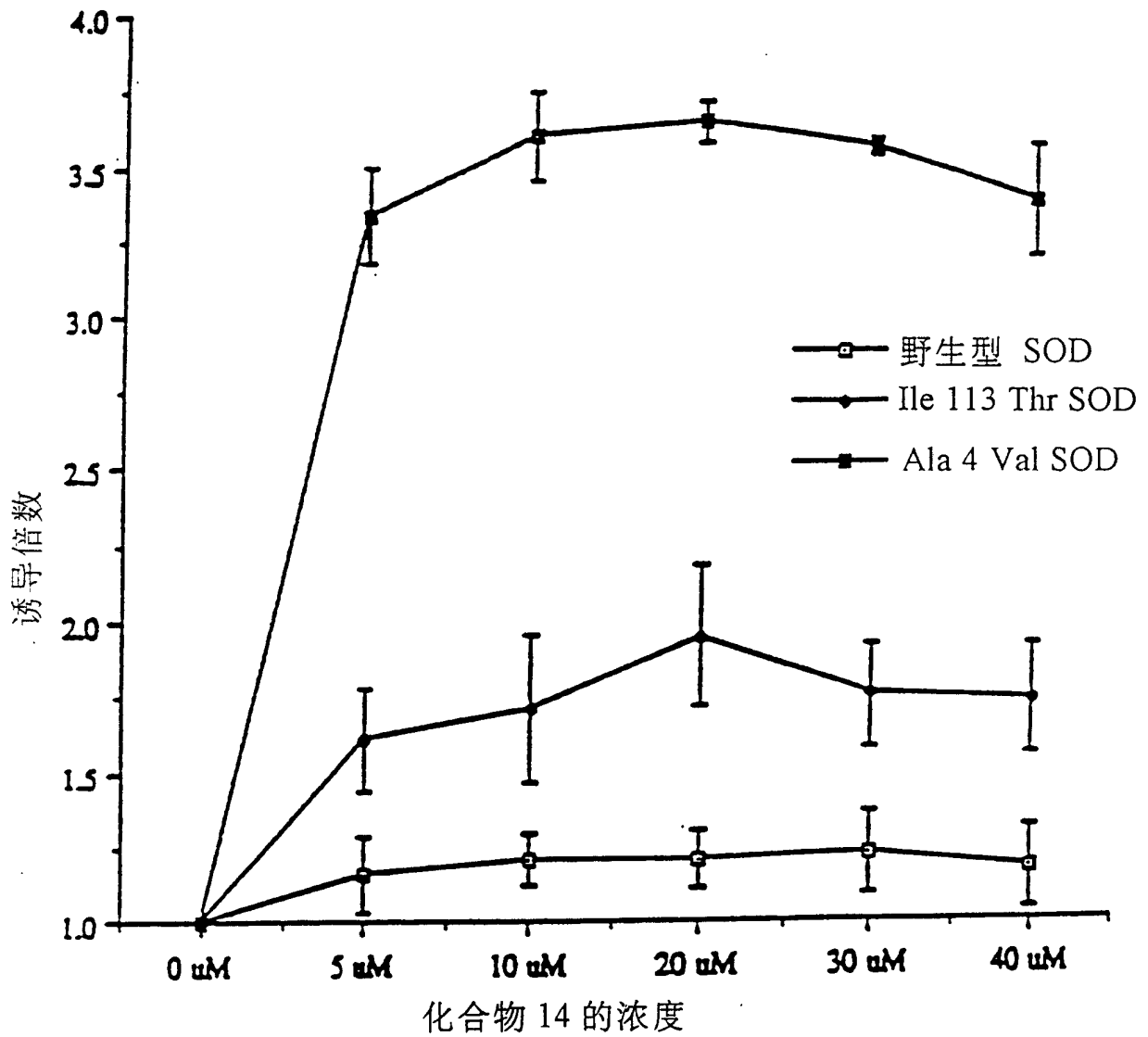


图 6

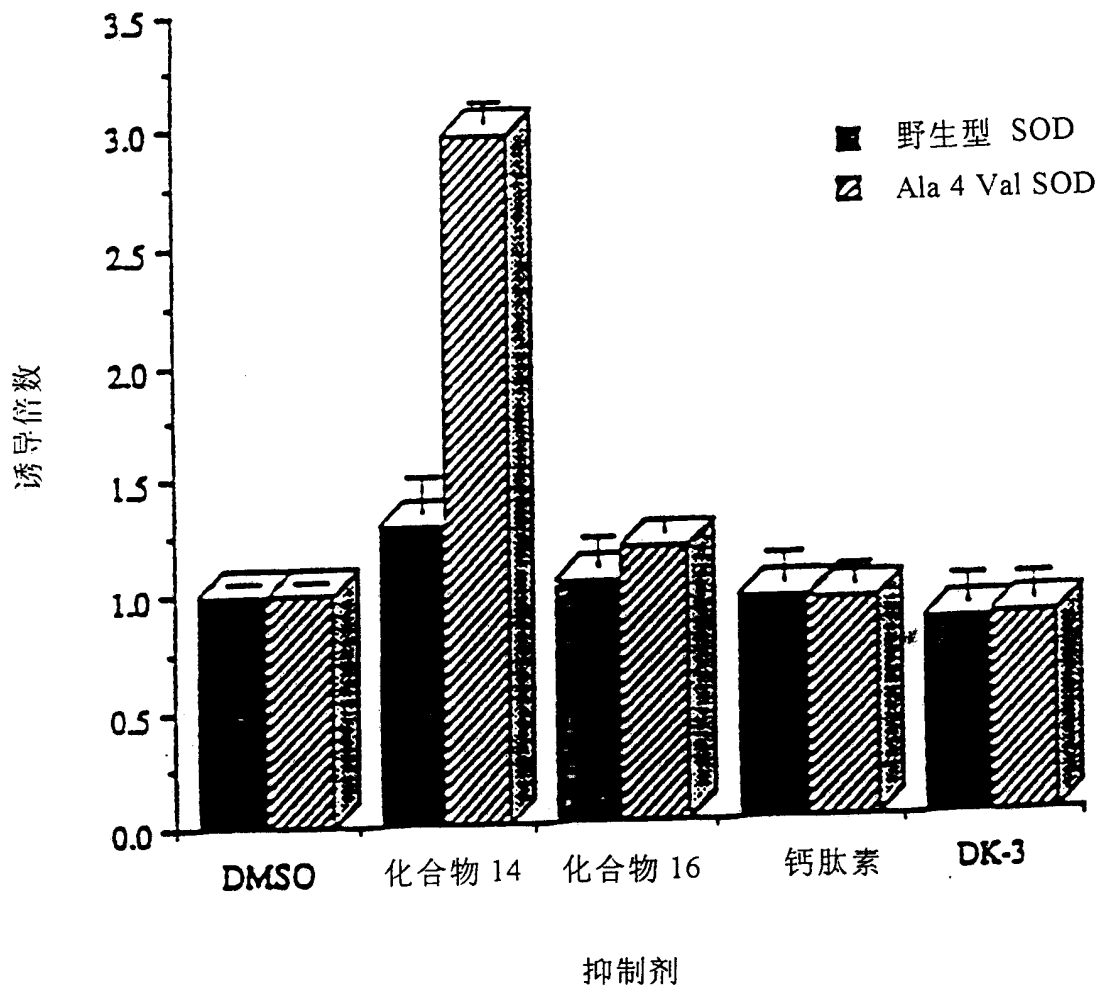


图 7