



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94194374.7

[51]Int.Cl⁶

C07D207 / 16

[43]公开日 1996 年 11 月 27 日

[22]申请日 94.11.8

[30]优先权

[32]93.12.2 [33]US[31]08 / 161,106

[86]国际申请 PCT / US94 / 12865 94.11.8

[87]国际公布 WO95 / 15310 英 95.6.8

[85]进入国家阶段日期 96.6.3

[71]申请人 默里尔药物公司

地址 美国俄亥俄

[72]发明人 N·P·皮特 J·P·布克哈特
S·米哈迪[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 唐伟杰

C07D417 / 06 C07D277 / 06

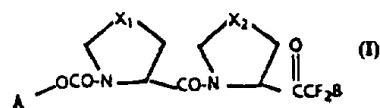
A61K 31 / 40 A61K 31 / 425

权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 脯氨酰肽链内切酶抑制剂

[57]摘要

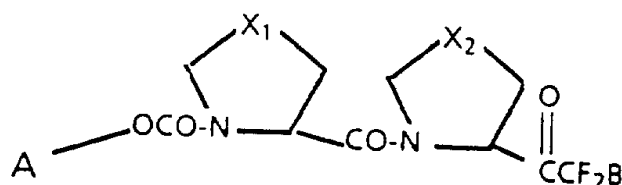
本发明涉及式(I)化合物,包括其全部立体异构体,组合物和制备它们的方法。本发明化合物由于其药物活性而直接用作脯氨酰肽链内切酶抑制剂,并因此提供了提高记忆力,预防或延缓遗忘症影响或记忆力缺失的方法。



权 利 要 求 书

1. 式 I 化合物, 包括其全部立体异构体,

式 I



其中:

A 是苄基或叔丁基保护基;

X₁ 是-S-或CH₂;和

X₂ 是-S-或CH₂;

B 是CF₃或CF₂CF₃的条件是:至少X₁和X₂其中之一是-S-。

2. 权利要求1的化合物,其中化合物是4-[[2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,苯基甲酯。

4. 一种药物组合物,它含有权利要求1-2之一的化合物和药物上可接受的载体。

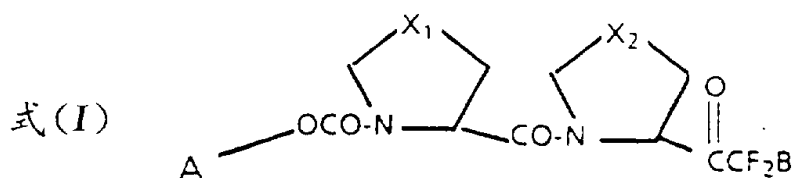
5. 一种药物组合物用于提高记忆力,包括使用有效量的权利要求1-2之一的化合物或药物组合物以及药物上可接受的载体。

6. 一种药物组合物用于预防或减缓遗忘症的影响,包括使用有效量的权利要求1-2之一的化合物以及药物上可接受的载体。

7. 一种药物组合物用于预防或减缓记忆力缺失,包括使用

有效量的权利要求 1—2 之一的化合物以及药物上可接受的载体。

8. 一种制备式 I 化合物, 包括其全部立体异构体的方法,



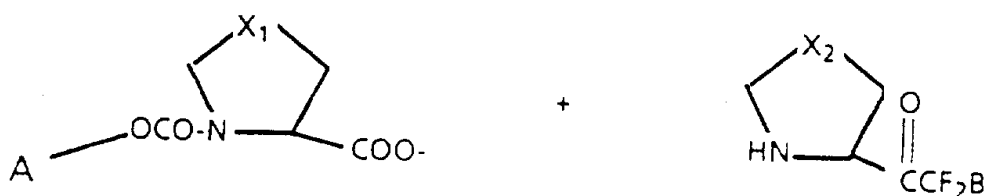
其中:

A 是苄基或叔丁基保护基;

X_1 是—S—或 CH_2 ; 和

X_2 是—S—或 CH_2 ;

B 是 CF_3 或 CF_2CF_3 的条件是: 至少 X_1 和 X_2 其中之一是—S—; 包括缩合下列适当保护的氨基酸:



9. 一种制备式 I 化合物的方法, 其中化合物是 4—[[2—(2,2,3,3,3—五氟—1—氧丙基)—1—吡咯烷基]羰基]—3—噻唑烷羧酸, 苯基甲酯。

说 明 书

脯氨酰肽链内切酶抑制剂

连到脯氨酸的肽键似乎对广泛专一肽酶有相当的耐受 (*Mentlein*, 1988), 说明水解含有脯氨酸的肽键可能在含脯氨酸肽的代谢作用中是重要的 (*Atack, et al., Eur. J. of pharm.*, 205, 157—163(1991))。脯氨酰肽链内切酶在含脯氨酸的生物活性肽的代谢中看来起着这种作用。这种酶水解许多含脯氨酸的生物活性肽, 如催产素, 促甲状腺激素释放激素, 促黄体激素释放激素, 血管紧张素 II, 血管舒缓激肽, 物质 P, 神经降压素和后叶加压素。

脯氨酰肽链内切酶作为羧基末端脯氨酸裂解酶能将活性肽降解。具体地, 脯氨酰肽链内切酶能够水解脯氨酸残基的羧基侧的肽键。脯氨酰肽链内切酶从机理上被认为是丝氨酸蛋白酶, 通过类似其它丝氨酸蛋白酶如 α -胰凝乳蛋白酶, 胰蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶的机理裂解肽键。

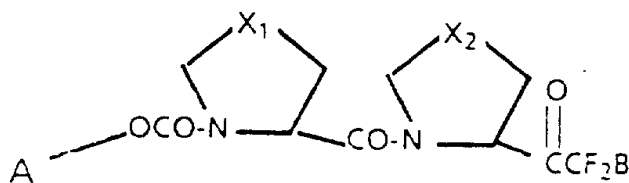
尽管这种酶普遍作用在含脯氨酸衍生物的肽键上, 但这种酶的形式在不同组织源表现是不同的, 其中该酶在底物专一性方面表现出差异。已经可以从多种植物 (胡萝卜, 蘑菇), 微生物 (*Flavobacterium menigosepticum*) 和动物组织中被纯化脯氨酰肽链内切酶。在动物全身普遍发现这种酶, 然而, 通常在 CNS 中发现的

脯氨酰肽链内切酶浓度最高(Wilk, 1983)。用于试验抗动物源的底物的常规酶源是牛,大鼠和鼠脑。

人们已经研究了脯氨酰肽链内切酶的低分子抑制剂。这些抑制剂一般是脯氨酸或含末端脯氨酸的小肽的化学衍生物。已经显示,苄氧羰基—脯氨酰—脯氨酸是这种酶专一过渡状态的抑制剂(Milk, S. and Orloeski, M., *J. Neurochem.*, 41, 69(1983), Friedman, et al., *Neurochem.*, 42, 237(1984))。L—脯氨酸或L—脯氨酰—吡咯烷的N—端取代物(Atack, et al., *Eur. J. of Pharm.*, 205, 157—163(1991), JP 03 56,460, EP 384,341),以及含脯氨酸的N—苄氧羰基(Z)二肽在羧基端的各种替代物已经被合成为脯氨酰肽链内切酶抑制剂(Nishikata, et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 34(7), 2931—2936(1986); Baker, A., et al., *Bioorganic & Medicinal Chem. Letts.*, 1(11), 585—590(1991))。已有报道,核心结构的硫代脯氨酸、噻唑烷和氧代吡咯烷的取代物可抑制脯氨酰肽链内切酶(Tsuru, et al., *J. Biochem.*, 94, 1179(1988), Tsuru, et al., *J. Biochem.*, 104, 580—586(1988), Saito, et al., *J. Enz. Inhib.*, 5, 51—75(1991), Uchida, I., et al., *PCT Int Appl. WO* 90 12,005, JP 03 56, 461, JP 03 56,462)。类似地,已经对脯氨酸羧基末端进行了各种修饰,包括各种氟化酮衍生物(Henning, EP 4, 912,127)。氟化酮衍生物的一般性合成已经被公开(Angelastro, M. R., et al., *Tetrahedron Letters* 33(23), 3265—3268(1992))。已经证明,通过其它化合物如酰基—脯氨酸或酰基肽—脯氨酸(Z—Gly—Pro—CH₂Cl)的氟甲基酮衍生物烷基化这种酶的活性部位可抑制该酶。(Yoshimoto, T., et al., *Biochemistry* 16, 2942(1977))。

本发明要求保护式 I 的肽衍生物, 包括其所有立体异构体:

式 I



其中:

A 为苄基或叔丁基;

X_1 为 $-S-$ 或 $-CH_2-$; 及 X_2 为 $-S-$ 或 $-CH_2-$ B 为 $-CF_3$ 或 $-CF_2CF_3$ 。

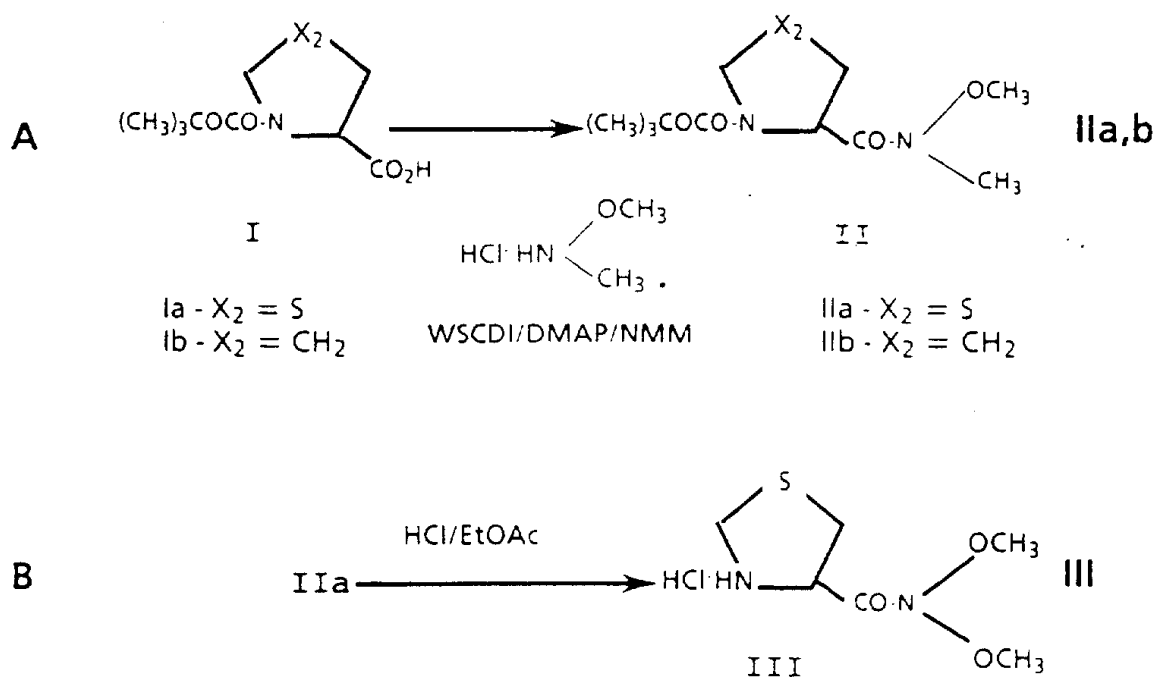
应该理解, 在马库什大组内应包括式 I 的优选化合物, 因此可进一步分组以形成含有所选取代基的小组。式 I 的优选分组以进一步包括这里所示的实施例为佳。

式 I 化合物是重要的脯氨酰肽链内切酶抑制剂。这种新的抑制剂是含有羧基末端五氟乙基取代基的二脯氨酰肽衍生物。在二脯氨酰肽衍生物中, 当 X_1 和 X_2 为硫时, 脯氨酸部分可任意被硫代脯氨酸衍生物取代。本发明肽类似物对脯氨酰肽链内切酶具有很强的抑制活性, 因此, 从科学意义上和对于重要的治疗来说, 本发明化合物可用于治疗遗忘症和记忆缺陷以及提高记忆能力。而且, 噻唑烷官能团的存在可增强这些化合物的效力和延长其作用时间。

本发明进一步的目的是抑制脯氨酰肽链内切酶的蛋白酶解活性, 并且作为一种恢复和提高记忆力的辅助治疗的模型。抑制蛋白酶解活性可以控制不必要的高水平的酶。已有报道, 脯氨酰肽链内切酶抑制剂对多组大鼠和小鼠模型具有抗记忆缺陷效果(参见

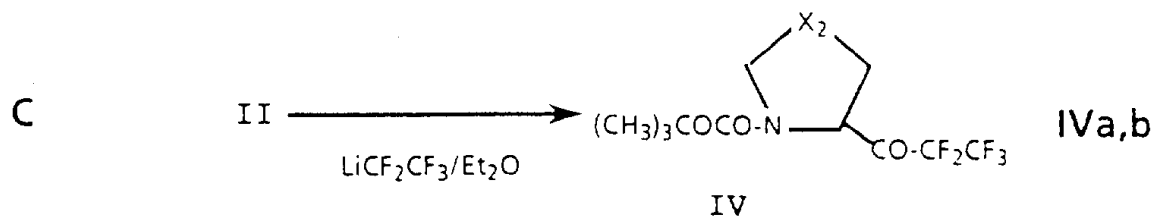
Yoshimoto, et al., *J. Pharmacobio — Dyn.*, 10, 730 (1983) 和 Saito, et al., *J. Enz. Inhib.*, 3, 163 (1990), Uchida, I., et al., *PCT Int Appl. WO 90 12, 005*). 然而, 不应受理论束缚, 应该相信, 脯氨酸链内切酶抑制性与提高记忆力的相互关系应归因于该酶降解后叶加压素的能力。再有, 脯氨酸链内切酶抑制剂已显示出逆转由东莨菪碱诱发的小鼠记忆力缺陷的效果 (Atack, et al., *Eur. J. of Pharm.*, 205, 157—163 (1991))。

本发明二肽的合成如流程 I 所示, 并在下面加以说明。

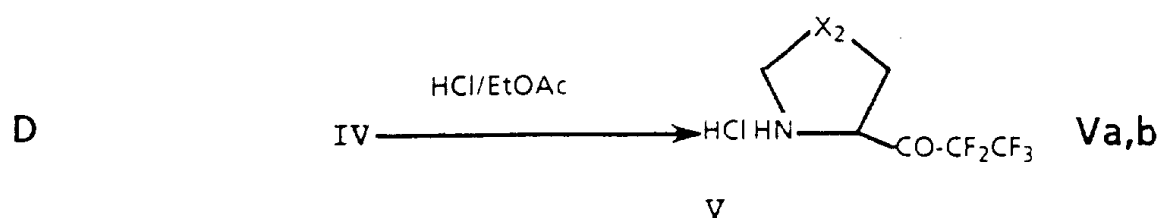


脯氨酸衍生物内切酶抑制剂的合成

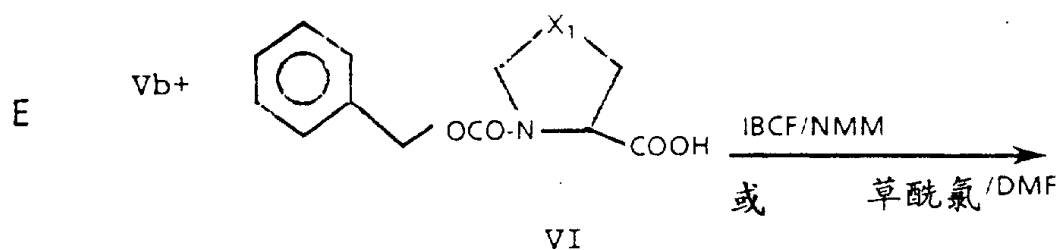
流程 I, 步骤 A 至 G 说明了式 I 化合物的合成



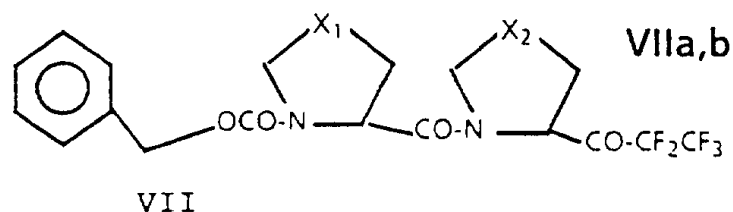
IVa - $\text{X}_2 = \text{S}$
IVb - $\text{X}_2 = \text{CH}_2$



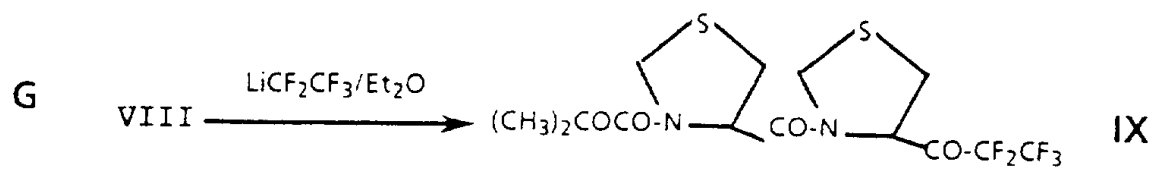
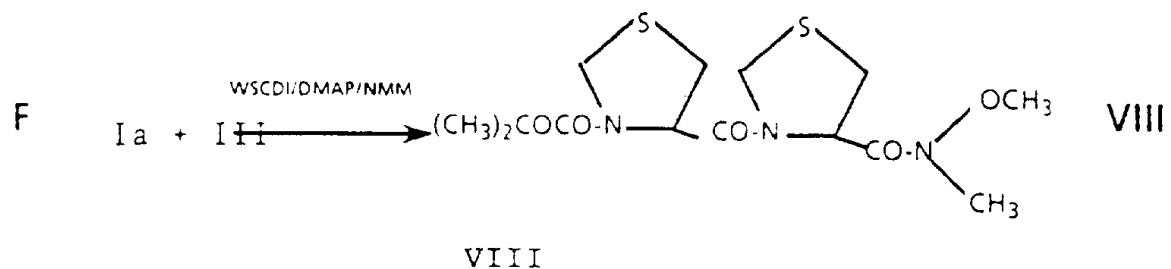
Va - $\text{X}_2 = \text{S}$
Vb - $\text{X}_2 = \text{CH}_2$



VIa - $\text{X} = \text{S}$
VIb - $\text{X} = \text{CH}_2$



VIIa - $\text{X}_1 = \text{S}, \text{X}_2 = \text{CH}_2$
VIIb - $\text{X}_1 = \text{CH}_2, \text{X}_2 = \text{CH}_2$



用 *Angelastro, M.*, *Tetrahedron Letters*, 33(23), 3265—3268 (1992) 和 *Nahm, S. and Weinreb, S. M.*, *Tetrahedron Letters*, 22, 3815 (1981) 所述方法基本上可制备用于合成含有羧基末端五氟乙基酮(化合物 *IVa* 和 *IVb*)或甲氧基甲氨基酰胺(化合物 *IIa* 和 *IIB*)的式 *I* 化合物的必要中间体。

流程 *I*, 步骤 *A* 说明了式 *IIa* 和 *IIB* 的甲氧基甲基氨基酰胺的一般制备方法。式 *IIa* 和 *IIB* 化合物可通过叔丁氧羰基保护的脯氨酸(2-吡咯烷羧酸, 1,1-二甲基乙酯)和硫代脯氨酸(噻唑烷-3, 4-二羧酸, 1,1-二甲基乙酯)衍生物与 *N,O*-二甲基羟胺盐酸盐反应制备。该反应基本上按 *Nahm, S. and Weinreb, S. M.*, *Tetrahedron Letters*, 22, 3815 (1981) 所述方法进行。一般, 用适宜的偶联剂如水溶性碳化二亚胺等可进行 *N,O*-二甲基羟胺盐酸盐的偶联, 并且用现有技术中已知的标准分离方法进行纯化。

步骤 *B* 说明了用适宜的酸如盐酸在乙酸乙酯中处理式 *IIa*, 可除去式 *IIa* 的硫代脯氨酸的叔丁氧羰基保护基, 并产生相应的 *N*-甲氧基-*N*-甲基-4-噻唑烷甲酰胺, 一盐酸盐(化合物 *III*)。然后用现有技术中的常规分离技术适当纯化最终产物。

通过步骤 *C* 可将化合物 *II* 转化为 *IVa* 和 *IVb* 的五氟乙基酮衍生物。与五氟乙基锂(从五氟乙基碘和甲基锂·溴化锂复合物就地产生的)的反应是化合物 *IIa* 和 *IIB* 的异羟肟酸酯分别转化为式 *IVa* 和 *IVb* 化合物的适宜方法。该反应基本上按 *Angelastro, M. R., et al.*, *Tetrahedron Letters*, 33(23), 3265—3268 (1992) 所述方法进行。用现有技术中的常规分离技术适当纯化最终产物。

步骤 *D* 说明了 *IVa* 或 *IVb* 的叔丁氧羰基保护基对酸是不稳定的并且可用适宜的酸处理除去,如在乙酸乙酯中用盐酸处理。用酸处理产生相应的式 *Va* 或 *Vb* 化合物(分别为 4-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-噻唑烷,一单盐酸盐或 2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-吡咯烷,盐酸盐)。用现有技术中的常规分离技术适当纯化最终产物。

步骤 *E* 概括地说明了两个适当保护的氨基酸的缩合形成 2-[[(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷基]羰基]-3-吡咯烷羧酸,苯基甲酯(*VIIb*)或 4-[[(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,苯基甲酯(*VIIa*)等。两个保护的氨基酸的缩合形成介于两个氨基酸间的酰氨键在现有技术中是已知的。几种已知的缩合方法包括化合物 *IV* 的羧基末端酸与草酰氯在适宜的溶剂如二甲基甲酰胺中缩合(如流程所示)。然后草酰氯可与 *Vb* 的 α -氨基缩合。用现有技术中的常规分离技术适当纯化最终产物。

步骤 *F* 说明了化合物 *VIII* 的二噻唑烷衍生物,如 4-[[4-[(甲氧基甲氨基)羰基]-3-噻唑烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,1,1-二甲基乙酯的制备。化合物如 *Ia* 与 *III* 和偶联剂缩合形成介于两个保护的氨基酸间的酰氨键在现有技术中是已知的。几种已知的缩合方法包括用各种碳化二亚胺如水溶性碳化二亚胺的缩合。用现有技术中的常规分离技术适当纯化最终产物。

如同步骤 *C*, 步骤 *G* 说明了具有末端甲氧基甲氨基羰基的二肽被取代。可用就地产生的五氟乙基锂(参见步骤 *C*)进行化合物 *VIII* 取代,形成相应的 4-[[4-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)羰基]

—3—噻唑烷基] 羰基—3—噻唑烷羧酸, 1,1—二甲基乙酯。取代后用现有技术中的常规分离技术适当纯化最终产物。

天然得到的脯氨酸衍生物含有手性碳原子。具体地, 脯氨酸和硫代脯氨酸的氮环的 α -碳原子是手性的。因此, 脯氨酸和噻唑脯氨酸衍生物存在着一个或多个可能的立体异构体。除非另有说明, 这里涉及的光学活性的氨基酸是L-构型。然而, 手性可具体标明为D-或L-构型。

可以理解, 酮官能团以酮和水合酮或两种状态的混合物的形式存在。例如, 五氟乙基酮基可被命名为2,2,3,3,3—五氟—1,1—二羟基丙基或2,2,3,3,3—五氟—1—氧丙基取代基。

用于多肽序列的每个氨基酸的 α -氨基保护基可以是在现有技术中已知的任何这种保护基。在所说的这类 α -氨基保护基中有(1)酰基型保护基如: 甲酰基, 三氟乙酰基, 邻苯二甲酰基, 甲苯磺酰基(*tosyl*), 苯磺酰基, 硝基—苯基亚磺酰基, 三苯甲基亚磺酰基, 邻硝基苯氧乙酰基和 α -氯丁酰基; (2)芳香尿烷型保护基如: 苄氧羰基和取代的苄氧羰基, 如对—氯苄氧羰基, 对—硝基苄氧羰基, 对—溴苄氧羰基, 对甲氧基苄氧羰基, 1-(对—联苯基) 1-甲基乙氧羰基, α -二甲基—3,5-二甲氧基苄氧羰基和二苯甲氧羰基; (3)脂肪尿烷保护基如叔—丁氧羰基(*Boc*), 二异丙基甲氧羰基, 异丙氧羰基, 乙氧羰基和烯丙氧羰基; (4)环烷基尿烷型保护基如环戊氧羰基, 金刚烷氧羰基和环己氧羰基; (5)硫尿烷型保护基如苯基硫代羰基; (6)烷基型保护基如三苯基甲基(*trityl*)和苄基; 和(7)三烷基硅烷如三甲基硅烷。优选的 α -氨基保护基是叔丁氧羰基(*Boc*)或苄氧羰基。

式 I 化合物作为治疗剂的应用及其给药方式将在以下说明。

治疗应用

本发明化合物作为提高记忆力的应用包括改进脑容量，回忆过去的能力和记住运动原活性。正是本发明化合物，它们可用于患有失语症，失用症，失认症，或任何类型的遗忘症，包括退化性和创伤后的遗忘症，良性健忘和科尔萨科夫综合征的病人(*Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 15th Additing* (1987))。因为本发明化合物对提高记忆力和功能恢复是非常有用的，所以还可用其预防或减缓记忆力缺失。

治疗用量

当用本发明二肽衍生物给需要治疗的患者时，其适当的剂量为每公斤体重每天 0.2mg/kg 至 250mg/kg，这种剂量还取决于其它因素如具体的患者和所选择的肽衍生物。对于具体患者适当的剂量很容易确定。优选每天给药 1—4 剂量，每剂量具体地为 5mg 至 100mg。本领域的技术人员很容易确定所需本发明肽的量。

这里使用的术语“患者”一般为哺乳动物如灵长类，包括人，羊，马，牛，猪，狗，猫，大鼠和小鼠。

虽然一些肽衍生物口服给药后未被肠吸收，因此，申请人优选非口服给药，例如，皮下，静脉，肌肉或腹膜内；通过存储注射(*depot injection*) 给药；通过灌输制剂；或在粘液膜，如鼻，喉和支气管

的粘液膜上给药,例如,以含有本发明肽衍生物的气雾剂形式如喷雾剂或干粉形式。

对于非肠道给药,可用本发明化合物可注射溶液或悬浮液剂量给药,这种溶液或悬浮液是由本发明化合物溶解在生理上可接受的稀释剂(可以是灭菌液体如水和油,并有或没有添加表面活性剂和其它药物上可接受的添加剂)中组成的。可用于这些制剂的油类有石油,动物或蔬菜油,或天然油(*synthetic origin*)如花生油,大豆油和矿物油。一般,水、盐水和葡萄糖水溶液和相应的糖溶液,乙醇和二醇类如丙二醇或聚乙二醇均为具体用于注射溶液的优选液体载体。

作为药理上有用的药剂,式 I 化合物可以各种方式给要治疗的患者进行给药以达到所需效果,因此,该化合物既可以单独给药也可以与药物上可接受的载体一起给药。

以下所列缩写用于描述本发明化合物或应用的实施例中。

缩写

<i>Boc-L-Pro-OH</i>	<i>N</i> -叔丁氧羰基- <i>L</i> -脯氨酸
<i>CBZ-L-Pro-OH</i>	<i>N</i> -苄氧羰基- <i>L</i> -脯氨酸
<i>CBZ-L-Pro-Cl</i>	<i>N</i> -苄氧羰基- <i>L</i> -脯氨酸酰氯
<i>CBZ-L-ThioPro-OH</i>	<i>N</i> -苄氧羰基- <i>L</i> -硫代脯氨酸
<i>CBZ-Gly-Pro-p-nitroanilide</i>	<i>N</i> -苄氧羰基-甘氨酸酰-L-脯氨酸-对-硝基苯胺

cm 厘米

DMAp 4-二甲氨基吡啶

DMSO 二甲亚砷

DTT	二硫苏糖醇
EDTA	乙二氨基四乙酸
HEPES	4-(2-羟基乙基)-1-哌嗪-乙磺酸
[I]	抑制剂的浓度
K_i	抑制常数
KOH	氢氧化钾
NMM	N-甲基吗啉
$^1\text{H-NMR}$	氢-1 核磁共振
$^{19}\text{F-NMR}$	氟-19 核磁共振
M	摩尔浓度
MH^+	质子化母体离子峰
ml	毫升
min	分钟
mol	摩尔
mmol	毫摩尔
nm	纳米
pH	氢离子浓度的负对数
[S]	底物浓度
TLC	薄层色谱
WSCDI	水溶性碳化二亚胺 即:1-(3-二甲氨基丙基)-3- 乙基碳化二亚胺盐酸盐
v_0	起始动力学速度

实施例

通过下列实施例(这些实施例纯粹是用来示范本发明的应用)的说明本发明将更加明了。根据这里所公开的本发明说明书或实例,本发明其它实例对本领域的技术人员将是明显的。本发明由表 1 中所给的非限定性实施例来说明,并在以下作进一步描述。

表 1

化合物	实施例号/ MDL 号	经验式	流程 1 结构
2 - [[2 - (2,2,3,3,3 - 五氟 - 1 - 氧丙基) - 1 - 吡咯烷基] 羰基] - 1 - 吡咯烷羧酸, 苯基甲酯	实施例 I 100,527 - 01	$C_{20}H_{21}F_5N_2O_4$	VIIb
4 - [[2 - (2,2,3,3,3 - 五氟 - 1 - 氧丙基) - 1 - 吡咯烷基] 羰基] - 3 - 噻唑烷羧酸, 苯基甲酯	实施例 II 102,916 - 01	$C_{19}H_{19}F_5N_2O_4S$	VIIa
4 - [[4 - (2,2,3,3,3 - 五氟 - 1 - 氧丙基) - 1 - 噻唑烷基] 羰基] - 3 - 噻唑烷羧酸, 1,1 - 二苯基乙酯	实施例 IV 100,676 - 01	$C_{15}H_{20}F_5N_2O_4S_2$	IX

实施例 1

I. 2-[[2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷基]羰基]-1-吡咯烷羧酸, 苯基甲酯(流程 I, 化合物 VIIb)的合成

IA. (R)-2-[(甲氧基甲氨基)羰基]-1-吡咯烷羧酸, 1,1-二苯基乙酯(流程 I, 化合物 I Ib)的合成

在氩气下向搅拌着的 *Boc-L-Pro-OH* (4.31g; 20.0 mmol) 和 *DMAP* (2.44g; 20.0 mmol) 的二氯甲烷(125ml)溶液中加入 *N,O*-二甲基羟胺盐酸盐(1.95g; 20.0 mmol) 和 *NMM* (2.20 ml; 20.0 mmol)。然后向溶液中加入水溶性碳化二亚胺(3.83g; 20.0 mmol)。使其反应过夜后浓缩至约 20 ml。将悬浮液装入 8 x 14 cm 硅胶柱上通过快速色谱法纯化浓的悬浮液, 用乙酸乙酯/己烷(60:40)洗脱。合并含有标题化合物(*R_f*=0.32)的流分并浓缩得到无色油状物(3.21g)。

质谱分析产物给出 $MH^+ = 259.1655$ [$C_{12}H_{23}N_2O_4$ 理论质谱为 $MH^+ = 259.1658$]。

IB. 2-(2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷羧酸, 1,1-二苯基乙酯(流程 I, 化合物 *IVb*)的合成

在氩气及 -78°C 下向搅拌着 2-[(甲氧基甲氧基)羰基]-1-吡咯烷羧酸, 1,1-二甲基乙酯(实施例 *IA* 的化合物; 1.03g; 4.00 mmol) 的乙酸乙酯(35ml)溶液中加入五氟乙基碘(1.5ml 12.8 mmol), 接着加入甲基锂. 溴化锂(1.5M 于乙醚; 7.5ml; 11.25 mmol)。在 -78°C 30 分钟后, 使溶液在冰-水浴中温热至 0°C 。加入 $KHSO_4$ (1.36g; 10.0 mmol) 的 H_2O (8 ml) 淬灭反应。剧烈搅拌几分钟使两相悬浮液均变清后将之转移到含有水(50ml)的分液漏斗中。分离两相并先后用半饱和 $NaHCO_3$ 水溶液(50ml)和盐水(25ml)洗涤有机相。用硫酸镁干燥有机相并浓缩得到淡黄色油(1.3g)。用快速色谱法在 5 x 15 cm 硅胶上纯化产物, 先后用 1.3 升乙酸乙酯/己烷(15:85)和乙酸乙酯/己烷(60:40)洗脱, 得到无色液体(0.94g)。

质谱分析产物给出 $MH^+ = 318.1135$ [$C_{12}H_7F_5NO_3$ 理论质谱为 $MH^+ = 318.1129$]。

IC. 2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)吡咯烷盐酸盐(流程 I, 化合物 **Vb**)的合成

向搅拌着的和在冰浴中冷却至 0°C 的 2-(2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷羧酸, 1,1-二甲基乙酯(实施例 **IB** 的化合物; 121mg , 0.38 mmol) 的乙酸乙酯(15ml)中通入 HCl 气体 5 分钟。停止通入 HCl 气体并盖住反应, 再搅拌 2 小时。然后浓缩反应至成为无色油状物, 用 KOH 片高真空干燥 3 小时产生固化产物(103mg)。

质谱分析产物给出 $MH^+ = 218.0601$ [$C_7H_9F_5NO$ 理论质谱为 $MH^+ = 218.0604$]。

ID. 2-[[2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷基]羰基]-1-吡咯烷羧酸, 苯基甲酯(流程 I, 化合物 **VIIb**)的合成

氩气下向搅拌的 **CBZ-L-Pro-OH** (0.62g , 2.49mmol) 和有一滴 DMF 的二氯甲烷(10ml)溶液中加入草酰氯(0.26ml ; 2.99mmol), 造成气体剧烈产生。气体产生停止之后, 将反应再搅拌 30 分钟。浓缩反应, 得到 *N*-苄氧羰基-L-脯氨酸(**CBZ-L-Pro-Cl**)为浅黄色油。

在 **CBZ-L-Pro-Cl** 中加入二氯甲烷(10ml), 然后在氩气下与 2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)吡咯烷盐酸盐(从实施例 **IC** 得到的化合物; 2.49mmol) 和溶解于二氯甲烷(7ml) 的 *N*-甲基吗

啉(0.54ml; 4.98mmol)的悬浮液反应。2.5 小时后将反应浓缩并放入二氯甲烷(1ml),产物在硅胶上用快速色谱法纯化,用乙酸乙酯/己烷(50:50)洗脱。收集含产物流分并浓缩,得到所需产物(0.52g)为无色油。

质谱分析产物给出 $MH^+ = 449.1508$ [$C_{20}H_{22}F_5N_2O_4$ 理论质谱为 $MH^+ = 449.1500$]。

II. 4-[[2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,苯基甲酯(流程 I,化合物 VIIa)的合成

IIA. 噻唑烷-3,4-二羧酸,3-苯基-甲酯(流程 I,化合物 VIa)的合成

向冷却在冰水浴并剧烈搅拌的 *L*-噻唑烷-4-羧酸(13.32g, 0.10mol)中加入氯甲酸苄酯(15.70ml, 0.11mmol),并用20分钟每次5ml地分批加入2*N* 氢氧化钠(55ml)。10 分钟后将反应升至室温并再搅拌30分钟。然后用乙醚(3×75ml)萃取,水相用6*N HCl* (将近20ml)酸化。收集分离的有机相并将之溶解于乙醚(100ml),然后用盐水(50ml)洗涤。有机相用硫酸钠干燥然后浓缩,得到粘性无色油(20.4g)。

IIB. 4-[[2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-1-吡咯烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,苯基甲酯(流程 I,化合物 VIIa)的合成

在氩气和-17℃下,向搅拌的 *CBZ-L-ThioPro-OH* (得自实施例 *IIa* 的化合物; 267mg; 1.00mmol)和 *NMM* (0.12ml; 1.

05mmol)的二氯甲烷(15ml)中加入氯甲酸异丁酯(0.13ml; 1.00mmol)。20分钟后加入NMM(0.12ml; 1.05mmol),接着用几分钟时间加入2-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)吡咯烷盐酸盐(化合物IC; 253mg; 1.00mmol)的乙腈(10ml)稀悬浮液。在-20℃1.5小时后将反应升至室温并搅拌1小时,然后浓缩反应并加入二氯甲烷(3ml)。将剩余物被放在4×15cm的硅胶柱上,用400ml乙酸乙酯/己烷(30:70)洗脱该柱,接着用乙酸乙酯/己烷(35:65)洗脱。合并含有产物的流分并浓缩,得到粘性无色油(63mg)。

质谱分析产物给出 $MH^+=467.1053$ [$C_{19}H_2O_5N_2O_4S$ 理论质谱为 $MH^+=467.1064$]。

III. 4-[[4-[(甲氧基甲氧基)羰基]-3-噻唑烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,1,1-二甲基乙酯(流程I,化合物VIII)的合成

IIIA. 噻唑烷-3,4-二羧酸,3-(1,1-二甲基乙基)酯(流程I,化合物Ia)的合成

向剧烈搅拌的L-噻唑烷-4-羧酸(10.0g; 75.09mmol)的THF/ H_2O (1:1; 100ml)中加入碳酸钠(11.94g; 0.11mol),接着加入二碳酸二叔丁酯(16.39g; 75.09mmol)。所得悬浮液在室温搅拌过夜。过滤反应物,将滤液装入盛有乙醚(100ml)的分液漏斗并分离各相。水相用新鲜乙醚(200ml)覆盖并用1N盐酸水溶液酸化。有机相依次用0.5N盐酸水溶液和盐水(50ml)洗涤,硫酸镁干燥并浓缩,得到白色固体(14.56g)。 ^1H-NMR 谱与理论结构相符:

10.56 (s - 1H, CO₂H), 4.78 (m - 1H, CH), 4.59 and 4.39 (pr d., 2H, J = 8Hz; NCH₂S), 3.22-3.36 (m, 2H, CH₂S), 1.43 [s, 9H, OC(CH₃)₃].

IIIB. 4-[(甲氧基甲氨基)羰基]-3-噻唑烷羧酸, 1,1-二甲基乙酯(流程 I, 化合物 **IIa**)的合成

在氩气下向搅拌的噻唑烷-3,4-二羧酸, 3-(1,1-二甲基乙基)酯(2.33g; 9.99mmol)和 *DMAP*(1.22g; 9.99mmol)的二氯甲烷(40 ml)中加入 *N, O*-二甲基羟基-胺盐酸盐(0.98g; 9.99mmol)和 *NMM*(1.10ml; 9.99mmol)的二氯甲烷(15ml)的悬浮液, 然后在该溶液中加入水溶性碳化二亚胺(1.92g; 9.99mmol)。反应允许放置过夜, 然后将反应浓缩至约 15ml。将所得悬浮液置于 6×10cm 硅胶柱进行快速色谱纯化, 用乙酸乙酯/己烷(50:50)洗脱。合并含有产物的流分(*R_f*=0.39)并浓缩, 得到无色油(1.95g)。

质谱分析产物给出 *MH*⁺=277.1216 [C₁₁H₂₁N₂O₄S 理论质谱为 *MH*⁺=277.1222]。

IIIC. *N*-甲氧基-*N*-甲基-4-噻唑烷-甲酰胺, 一盐酸盐(流程 I, 化合物 **III**)的合成

向冷却在冰水浴并搅拌的 4-[(甲氧基甲氨基)羰基]-3-噻唑烷羧酸, 1,1-二甲基乙酯(得自实施例 **IIIB**; 1.05g; 3.80mmol)的乙酸乙酯溶液中通入 *HCl* 气 10 分钟。加入上述气体后将反应盖住, 再搅拌 2 小时。然后浓缩反应得到无色油, 用 *KOH* 片高真空干燥 3 小时, 得到固化的白色固体(0.76g)。

IIID. 4-[[4-[(甲氧基甲氨基)羰基]-3-噻唑烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,1,1-二甲基乙酯(流程 I,化合物 VIII)的合成

在氩气下向搅拌的 3,4-噻唑烷羧酸,3-(1,1-二甲基乙基)酯(得自实施例 IIIA; 0.81g; 3.49mmol) 和 DMAP(0.43g; 3.49mmol) 的二氯甲烷(20ml) 中添加 NMM(0.38ml; 3.49mmol), 接着加入 *N*-甲氧基-*N*-甲基-4-噻唑烷甲酰胺, 一盐酸盐(得自实施例 IIIC; 0.76g; 3.49mmol) 的二氯甲烷(10ml) 和水溶性碳化二亚胺(0.69g; 3.49mmol)。反应完成之后将反应浓缩至约 10ml, 然后装入 5×13cm 硅胶柱进行快速色谱分离, 用丙酮/乙酸乙酯(8:92)作洗脱剂。合并含有产物的流分($R_f=0.66$)并浓缩, 得到白色泡沫(0.35g)。

质谱分析产物给出 $MH^+=392.1324$ [$C_{15}H_{10}N_3O_5S_2$ 理论质谱为 $MH^+=392.1314$]。

IV. 4-[[4-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-3-噻唑烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,1,1-二甲基乙酯(流程 I,化合物 IX)的合成

IVA. 4-[[4-(2,2,3,3,3-五氟-1-氧丙基)-3-噻唑烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,1,1-二甲基乙酯(流程 I,化合物 IX)的合成

在氩气和 -78℃ 下, 向搅拌的 4-[[4-[(甲氧基甲氨基)羰基]-3-噻唑烷基]羰基]-3-噻唑烷羧酸,1,1-二甲基乙酯(得自实施例 IIID; 0.33g; 0.84mmol) 的乙醚(30ml) 溶液中添加全氟乙基碘(0.32ml, 2.70mmol), 接着加入甲基碘·溴化锂(1.57ml, 2.36mmol, 1.5M 于乙醚)。TLC 指示反应完成后, 将反应物倒入含

25g 硅胶的 100ml 乙醚中。将烧瓶中剩余的产物溶解于乙醚，并加到硅胶/乙醚溶液中。接着，除去有机相，硅胶部分用乙醚(2×100ml)洗涤。合并的有机相用硫酸钠和硫酸镁干燥，然后过滤和蒸发，得到油状白色泡沫(0.34g)。将该产物在 4×10cm 硅胶柱上进行快速色谱分离，依次用 0.4L 乙酸乙酯/己烷(30:70)和 0.5L 乙酸乙酯/己烷(75:25)洗脱。合并含有产物的流分并浓缩成油(49mg)。

质谱分析产物给出 $MH^+ = 451.0799$ [$C_{15}H_{20}F_5N_2O_4S_2$ 理论质谱为 $MH^+ = 451.0785$]。

合成测定

合成反应之后一般要在有展开剂乙酸乙酯：己烷溶剂的 *Analtech* 硅胶盘上进行 *TLC*。通过用碱性高锰酸钾然后加热该盘来确定化合物。

V. 酶抑制性的测定

除了用 50mM *HEPES* ($pH7.4$) 代替 *Tris* 缓冲剂外，基本上按照 *Yoshimoto et al.*, (*Biochem.*, 94, 1179 (1983))所述方法从牛脑部分纯化得到脯氨酰肽链内切酶。这种酶制备方法适于常规抑制性测量；然而，该酶可以用下述方法进一步纯化。该酶的纯度状态希望不影响测量值 K_i 。将含有 50—80% 硫酸铵的切片重新溶解于匀化的缓冲剂，然后以 1ml/min 流速通过一个 *Pharmacia Mono Q* 柱(0.5×5cm)来脱盐，用 5ml 缓冲剂 A 到缓冲剂 B(全部缓冲剂为 20ml；缓冲剂 A = 50mM *HEPES*, $pH7.4$, 1mM *EDTA* 和 1mM *DTT*；缓冲剂 B = 缓冲剂 A + 0.5M *NaCl*)来洗涤该柱。酶活性在约

$[NaCl]=0.25M$ 洗脱。初步数据表明该酶长时间(超过 1—2 个月)贮存是不稳定的。因此,优选使用新制备的酶。

在缓冲剂 A(3.0ml), 37°C 和含有 $20\mu M$ 底物(CBz—Gly—Pro—硝基—N—(某)酰苯胺)情况下对该酶进行测定,监测到在 $410nm$ ($410nm = 8.4mM \cdot 1cm^{-1}$) 处吸收增加。将抑制剂包容溶液放入 DMSO。为表征可逆竞争抑制剂,在 $[S] = 50\mu M$ (底物的 K_M 为 $11\mu M$) 条件下测量三种抑制剂浓度的初始速率。如果发现结合缓慢,则用最终平衡的速率计算。

竞争抑制剂的 K_i 用已知公式计算:

$$v_0/v_i = (1 + [I]/K_{i,app})$$

$$\text{和 } K_i = K_{i,app}/(1 + [S]/K_M)$$

其中:

v_0 为无抑制剂存在时的初始速率;

v_i 为有浓度为 $[I]$ 的抑制剂存在时的初始速率;

$[S]$ 为底物浓度。

如果观察到“缓慢结合”(即达到结合平衡是缓慢的),则 v_i 表示的是最终稳定状态的速率而非初始速率。

用上述方法对各式 I 化合物进行测量并计算出酶抑制常数。表 2 给出了指定试验化合物的测定数据。

表 2

化合物	MDL 号	酶抑制性
2 - [[2 - (2,2,3,3,3 - 五氟 - 1 - 氧丙基) - 1 - 吡咯烷基] 羧基] - 1 - 吡咯烷羧酸, 苯基甲酯	实施例 I 100,527 - 01	$1.4 \times 10^{-9} \text{M}$
4 - [[2 - (2,2,3,3,3 - 五氟 - 1 - 氧丙基) - 1 - 吡咯烷基] 羧基] - 3 - 噻唑烷羧酸, 苯基甲酯	实施例 II 102,916 - 01	$1.0 \times 10^{-9} \text{M}$
4 - [[4 - (2,2,3,3,3 - 五氟 - 1 - 氧丙基) - 3 - 噻唑烷基] 羧基] - 3 - 噻唑烷羧酸, 1,1 - 二苯基乙酯	实施例 IV 100,676 - 01	$1.0 \times 10^{-9} \text{M}$

化合物也可以在体内用各种方法进行试验, 包括 *Attack* (*Attack, Eur. J. Pharm.*, 205, 157—163(1991))所述方法或本领域中所述或已知的其它方法。例如, 可将化合物以盐水形式或与载体如甲基纤维素一起经腹膜内注射给雄性 *BKTO* 小鼠 (25—30g), 并在适当时间处死后除下脑和肾。将这些器官的组织在 10 ml (约 20 倍体积) 冰 — 冷却的分析缓冲液中匀浆, 通过如 *Lowry, et al.* (*Lowry, et al., J. Biol. Chem.* 193, 265(1951))所述方法用等分的匀浆测定蛋白质的浓度。将 199 μl 粗匀浆等分液在室温培养 2 分钟, 处死动物到鉴定终止的总时间约为 3 分钟, 这样, 可使抑制剂的变异减少到最小。用每毫克中的蛋白质活性表示活性, 用相对于处理后的动物载体的百分比表示。

化合物对记忆力的行为作用可用各种方法进行试验, 包括 *Attack* (*Attack, Eur. J. Pharm.*, 205, 157—163(1991))所述方法。化合物对记忆力的作用可通过用小鼠被动—无效模型测定东莨菪碱诱发记忆力缺陷的恢复进行试验。在这个模型中, 小鼠被分成几组, 各组分别接受 (1) 注射载体; (2) 注射载体和东莨菪碱 (即: 约 0.2mg/ml); 或 (3) 注射各种剂量的化合物 (即: 约 0.1mg/ml—1.0mg/ml), 然后将小鼠放在亮/暗两室盒子的亮室中。在小鼠进入暗室一侧时

将动物电激一下(即:约2秒,约0.4mA)。记录进入暗室所花费的时间(徘徊时间)。第二天,将小鼠移回到盒子的亮室一侧,再记录进入暗室时的徘徊时间。在此模型中,记忆力缺失与否跟接连两天走入暗室所花费的时间差直接相关。如果第二天花费的时间较长,则说明尚有记忆力;否则,若两次的时间无差别,则表示记忆力缺失。

在具体描述性实例中不脱离本发明范围的变化和修改是允许的,这个范围仅由所附权利要求书限定。