

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03818793.0

[51] Int. Cl.

C07D 217/24 (2006.01)

C07D 239/90 (2006.01)

A61K 31/472 (2006.01)

A61K 31/517 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 6 月 24 日

[11] 授权公告号 CN 100503572C

[22] 申请日 2003.6.27 [21] 申请号 03818793.0

[30] 优先权

[32] 2002.6.28 [33] US [31] 60/392,592

[32] 2002.12.20 [33] US [31] 60/435,073

[86] 国际申请 PCT/US2003/020557 2003.6.27

[87] 国际公布 WO2004/002961 英 2004.1.8

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.4

[73] 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

[72] 发明人 R·尼格特尔 M·莫特默尔

J·斯塔德利 D·米伦

[56] 参考文献

DD232699A1 1986.2.5

WO0142216A2 2001.6.14

审查员 赵霞

[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 李华英

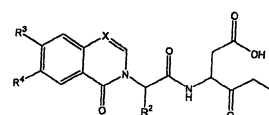
权利要求书 8 页 说明书 65 页

[54] 发明名称

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂及其
用途

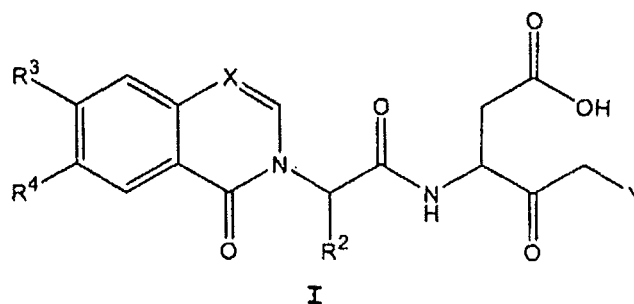
[57] 摘要

本发明涉及可用作天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂的式(I)化合物。本发明也提供包括所述化合物的药学上可接受的组合物，制备该化合物的方法，和在治疗各种疾病、状况、或病症中使用该化合物和组合物的方法。



(I)

1. 式 I 的化合物:



其中:

X 是 CH;

Y 是卤素, 三氟苯氧基, 或四氟苯氧基;

R² 是乙基、正丙基或异丙基;

R³ 是氢, 卤素, OCF₃, CN, 或 CF₃; 而

R⁴ 是氢, 卤素, OCF₃, SR, CN, CF₃, Ar, 或 T-Ar;

其中:

T 是 O 或 S;

R 是 C₁₋₆ 直链或支链烷基;

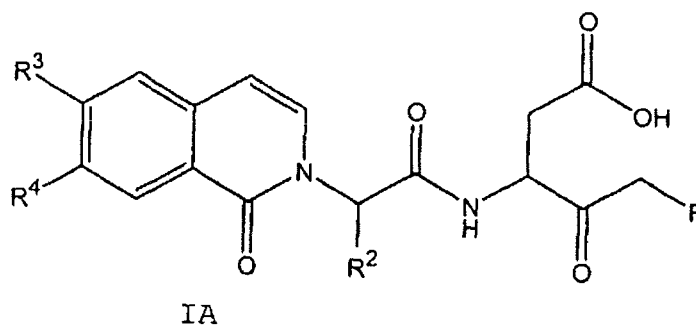
Ar 是任选被 1-3 个选自卤素、CH₃、CF₃、CN、OMe、OCF₃、和 NR⁵R⁶ 的基团取代的苯环; 而

R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为 H 或 C₁₋₆ 直链或支链烷基, 或者 R⁵ 和 R⁶ 合起来形成任选含最多 3 个选自 O、S、NH、和 N(C₁₋₆ 直链或支链烷基) 的杂原子的 5-7 元环;

条件是, 当 Y 是卤素时, R³ 和 R⁴ 两者不同时为氢。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 Y 是 F, 三氟苯氧基, 或四氟苯氧基。

3. 根据权利要求 1 的化合物, 其具有下式 IA 的结构:



其中:

R^2 是乙基, 正丙基, 或异丙基; 而

R^3 和 R^4 彼此独立地是氢, 卤素, OCF_3 , CN , CF_3 , 或 Ar , 条件是 R^3 和 R^4 两者不同时为氢。

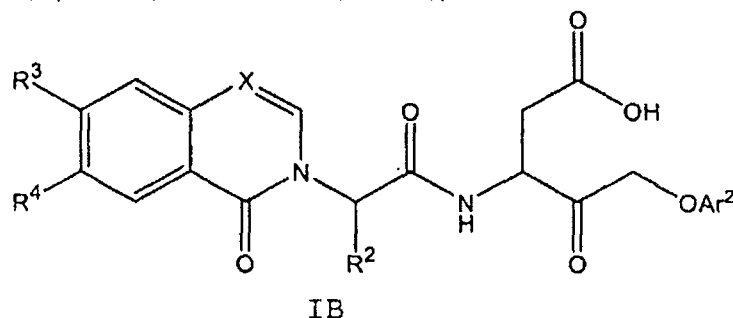
4. 根据权利要求 3 的化合物, 其中 R^2 是乙基。

5. 根据权利要求 3 或 4 的化合物, 其中 R^3 是氢。

6. 根据权利要求 5 的化合物, 其中 R^4 是 F , Cl , CN , Ar , 或 CF_3 。

7. 根据权利要求 6 的化合物, 其中 R^4 是 Cl 或 CF_3 。

8. 根据权利要求 1 的化合物, 其具有式 IB 的结构:



其中:

X 是 CH ;

R^2 是乙基, 正丙基, 或异丙基;

R^3 和 R^4 彼此独立地是氢, 卤素, OCF_3 , CN , 或 CF_3 ; 而

Ar^2 是三氟苯基或四氟苯基。

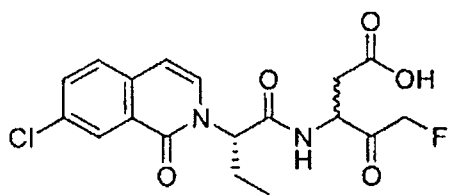
9. 根据权利要求 8 的化合物, 其中 Ar^2 是 2, 3, 5, 6-四氟苯基。

10. 根据权利要求 8 的化合物, 其中 R^2 是乙基。

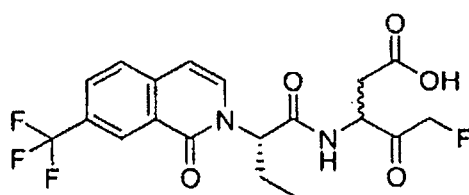
11. 根据权利要求 8-10 任一项的化合物, 其中 R^3 是氢, R^4 是 F , Cl , 或 CF_3 。

12. 根据权利要求 11 的化合物, 其中 R^4 是 Cl 或 CF_3 。

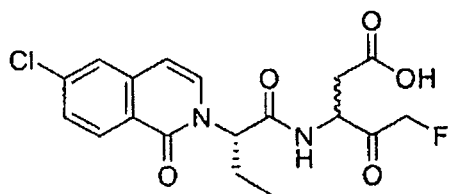
13. 根据权利要求 1 的化合物, 其选自:



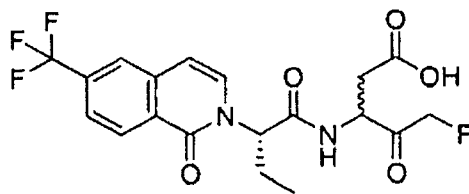
1.



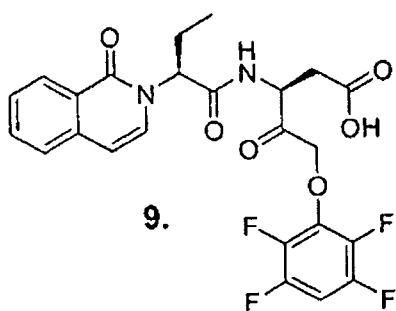
2.



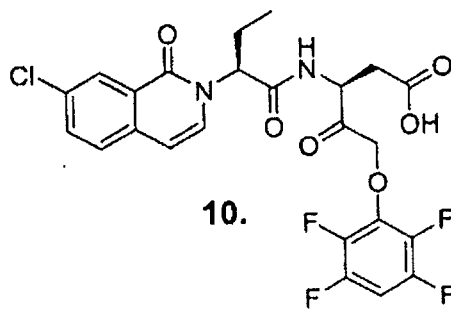
3.



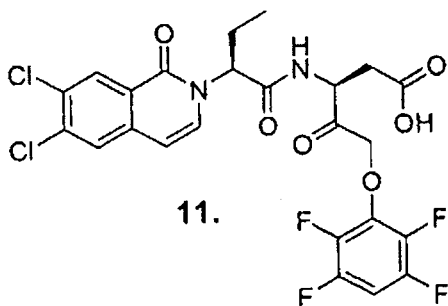
4.



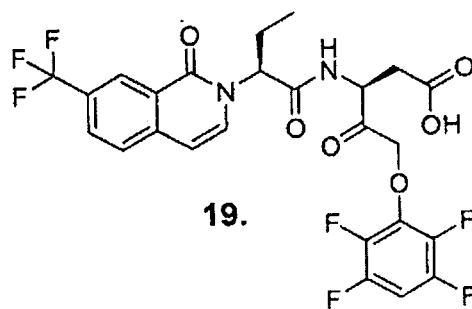
9.



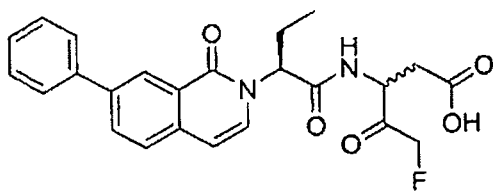
10.



11.



19.



21.

14. 一种药物组合物，其包括：

- a) 权利要求 1-13 任一项的化合物；和
- b) 药学上可接受的载体，助剂或赋形剂。

15. 根据权利要求 1-13 任一项的化合物用于制备治疗患者中下列疾病的药物的用途，其中所述疾病选自 IL-1 介导的疾病、细胞凋亡介导的疾病、炎性疾病、自身免疫疾病、破坏性骨疾病、增殖性疾病、传染性疾病、变性疾病、与细胞死亡有关的疾病、过度饮酒、病毒介导的疾病、视网膜疾病、眼色素层炎、炎性腹膜炎、骨关节炎、胰腺炎、哮喘、成人呼吸窘迫综合征、肾小球性肾炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、慢性甲状腺炎、格累夫斯氏病、自身免疫性胃炎、糖尿病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性中性白细胞减少症、血小板减少症、慢性活动性肝炎、重症肌无力、炎性肠疾病、节段性回肠炎、牛皮癣、特应性皮炎、疤痕形成、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥反应、烧伤后的器官细胞凋亡、骨质疏松、白血病和相关疾病、骨髓发育不良综合征、多发性骨髓瘤-相关性骨疾病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、转移性黑瘤、卡波济氏肉瘤、多发性骨髓瘤、出血性休克、脓毒病、脓毒性休克、烧伤、志贺氏菌病、早老性痴呆、帕金森氏症、杭廷顿氏舞蹈症、肯尼迪氏疾病、朊病毒疾病、脑局部缺血、癫痫、心肌缺血、急性和慢性心脏病、心肌梗塞、充血性心衰、动脉粥样硬化、冠状动脉旁路移植术、脊柱肌肉萎缩、肌萎缩性侧索硬化、多发性硬化、HIV-相关性脑炎、衰老、脱发、中风引起的神经病性损伤、溃疡性结肠炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、乙型肝炎、丙型肝炎、庚型肝炎、黄热病、登革热或日本脑炎、各种形式的肝脏疾病、肾脏疾病、多囊性肾疾病、与幽门螺旋杆菌有关的胃和十二指肠溃疡、HIV 感染、结核病、脑膜炎、器官衰竭、与冠状动脉旁路移植术有关的并发症以及各种形式的癌症。

16. 根据权利要求 15 的用途，其中所述疾病是细胞凋亡介导的疾病、炎性疾病、自身免疫疾病、破坏性骨疾病、增殖性疾病、传染性疾病、变性疾病、与细胞死亡有关的疾病、过度饮酒、病毒介导的疾

病、炎性腹膜炎、骨关节炎、肾小球性肾炎、类风湿性关节炎、糖尿病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性中性白细胞减少症、血小板减少症、慢性活动性肝炎、疤痕形成、移植物抗宿主疾病、器官移植排斥反应、烧伤后的器官细胞凋亡、骨质疏松、白血病和相关疾病、骨髓发育不良综合征、转移性黑瘤、出血性休克、脓毒病、脓毒性休克、烧伤、志贺氏菌病、早老性痴呆、帕金森氏症、杭廷顿氏舞蹈症、肯尼迪氏疾病、朊病毒疾病、脑局部缺血、癫痫、心肌缺血、急性和慢性心脏病、心肌梗塞、充血性心衰、动脉粥样硬化、冠状动脉旁路移植术、脊柱肌肉萎缩、肌萎缩性侧索硬化、多发性硬化、HIV-相关性脑炎、衰老、脱发、中风引起的神经病性损伤、创伤性脑损伤、脊髓损伤、乙型肝炎、丙型肝炎、庚型肝炎、各种形式的肝脏疾病、肾脏疾病、多囊性肾疾病、与幽门螺旋杆菌有关的胃和十二指肠溃疡、HIV 感染、结核病、脑膜炎、与冠状动脉旁路移植术有关的并发症以及各种形式的癌症。

17. 根据权利要求 16 的用途，其中所述疾病是与冠状动脉旁路移植术有关的并发症。

18. 根据权利要求 1-13 任一项的化合物用于制备在患者中抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶介导的功能的药物的用途。

19. 根据权利要求 1-13 任一项的化合物用于制备在患者中减少 IGIF 或 IFN- γ 产生的药物的用途。

20. 根据权利要求 1-13 任一项的化合物或其可药用衍生物在制备用于保藏细胞的制剂中的用途。

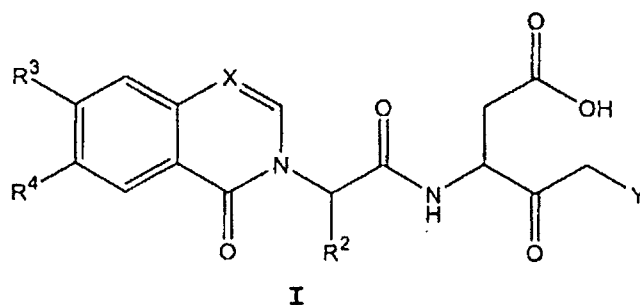
21. 根据权利要求 20 的用途，其中所述细胞处于

a) 用于移植的器官中；或

b) 血液产品中。

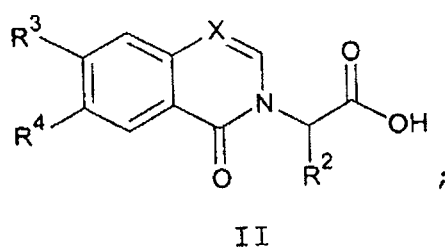
22. 根据权利要求 1-13 任一项的化合物用于制备药物的用途，其中所述药物用作治疗癌症的免疫疗法的组成部分。

23. 制备式 I 化合物的方法，

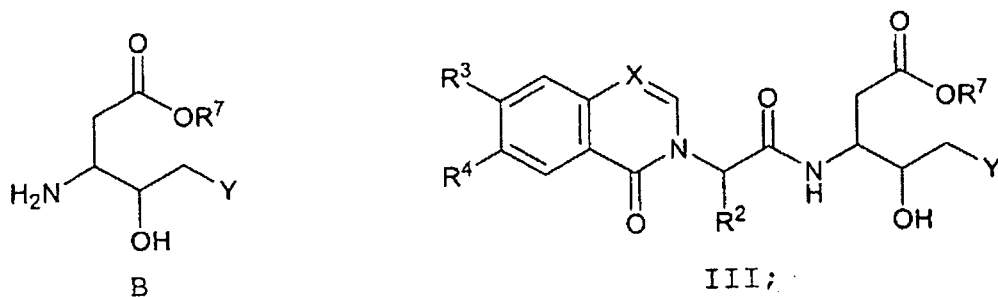


所述方法包括以下步骤:

使式 II 的酸或酸衍生物:



与式 B 的氨基醇反应, 形成式 III 的化合物,



和将中间体 III 转化为化合物 I, 其中:

X 是 CH;

Y 是卤素, 三氟苯氧基, 或四氟苯氧基;

R² 是乙基、正丙基或异丙基;

R³ 是氢, 卤素, OCF₃, CN, 或 CF₃; 而

R⁴ 是氢, 卤素, OCF₃, SR, CN, CF₃, Ar, 或 T-Ar;

其中:

T 是 O 或 S;

R 是 C_{1-6} 直链或支链烷基;

Ar 是任选被 1-3 个选自卤素、 CH_3 、 CF_3 、CN、OMe、 OCF_3 、和 NR^5R^6 的基团取代的苯环;

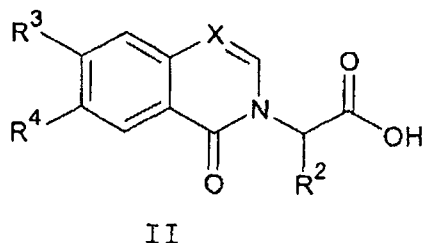
R^5 和 R^6 各自独立地为 H 或 C_{1-6} 直链或支链烷基, 或者 R^5 和 R^6 合起来形成任选含最多 3 个选自 O、S、NH、和 $N(C_{1-6}$ 直链或支链烷基) 的杂原子的 5-7 元环; 而

R^7 是适当的保护基,

条件是, 当 Y 是卤素时, R^3 和 R^4 两者不同时为氢。

24. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述 R^7 中的适当的保护基是叔丁基。

25. 式 II 的化合物:



其中:

X 是 CH;

R^2 是乙基、正丙基或异丙基;

R^3 是氢, 卤素, OCF_3 , CN, 或 CF_3 ; 而

R^4 是氢, 卤素, OCF_3 , SR, CN, CF_3 , Ar, 或 T-Ar;

其中:

T 是 O 或 S;

R 是 C_{1-6} 直链或支链烷基;

Ar 是任选被 1-3 个选自卤素、 CH_3 、 CF_3 、CN、OMe、 OCF_3 、和 NR^5R^6 的基团取代的苯环; 而

R^5 和 R^6 各自独立地为 H 或 C_{1-6} 直链或支链烷基, 或者 R^5 和 R^6 合

起来形成任选含最多 3 个选自 O、S、NH、和 N(C₁₋₆ 直链或支链烷基) 的杂原子的 5-7 元环。

26. 根据权利要求 25 的化合物, 其中 R² 是乙基或异丙基。

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂及其用途

相关申请的交叉参考

本申请要求 2002 年 6 月 28 日提交的美国临时专利申请 60/392,592 和 2002 年 12 月 20 日提交的美国临时专利申请 60/435,073 的优先权，它们的内容在这里引作参考。

技术领域

本发明属于药物化学领域，并且涉及可以抑制介导细胞凋亡和炎症的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)的化合物及其药物组合物。本发明还涉及制备所述化合物方法和使用本发明的化合物和药物组合物治疗与天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶活性有关之疾病的方法。

背景技术

细胞凋亡或程序性细胞死亡是生物体排除不需要的细胞的重要机制。已证实细胞凋亡的失调(可以是过度的细胞凋亡或无法发生细胞凋亡)与一系列疾病例如癌症、急性炎症和自身免疫性疾病、局部缺血性疾病和某些神经变性疾病有关(参见 Science, 1998, 281, 1283-1312(1998); Ellis 等, Ann.Rev. Cell.Biol., 1991, 7, 663(1991))。

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶是一族半胱氨酸蛋白酶，它是细胞凋亡和细胞分解的信号传导途径的重要递质(Thornberry, Chem. Biol., 1998, 5, R97-R103(1998))。这些信号传导途径随着细胞类型和刺激而改变，但所有的细胞凋亡途径似乎均集中于一种共同的导致重要蛋白发生蛋白分解的效应物途径。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶涉及信号传导途径的效应期及其引发时的上游。涉及引发事件的上

游天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶被激活并随后激活涉及细胞凋亡晚期的其它天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶。

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 是第一个被证实的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶，它也被称为白介素转化酶或“ICE”。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 通过将前体白介素-1 β (“pIL-1 β ")在 Asp-116 和 Ala-117 之间特异性地裂解将 pIL-1 β 转化成致炎活性形式。除天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 之外，还有 11 种其它已知的人类天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶，所有这些酶均可以在天冬氨酰残基处进行特异性地裂解。还发现它们必需要求在裂解部位的 N-末端一侧有至少 4 个氨基酸残基。

依据其优选的或主要识别的氨基酸序列可将天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶分为 3 组。已证实包含天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 1、4、5 和 13 的一组天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶优选裂解部位 N-末端侧 4 位上的疏水性芳香族氨基酸。包含天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 2、3 和 7 的另一组可以识别裂解部位 N-末端侧 1 位和 4 位上的天冬氨酰残基，并优选 Asp-Glu-X-Asp 序列。包含天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 6、8、9 和 10 的第三组可以容许主要识别序列中的多种氨基酸，但似乎优选带有支链脂肪族侧链的残基例如 4 位上的缬氨酸和亮氨酸。

还根据所了解的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的功能对其进行了分组。第一亚族由天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 (ICE)、4、5 和 13 组成。已证实这些天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶与致炎细胞因子的加工有关，因此在炎症中起重要作用。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 是这一类型的酶中研究的最多的酶，它可以通过蛋白分解作用激活 IL-1 β 前体。因此该酶在炎症反应中起重要作用。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 还与干扰素- γ 诱导因子 (IGIF) 的加工有关，该因子可以刺激干扰素 γ 的生产，而干扰素 γ 是调节抗原呈递、T 细胞激活和细胞粘着的重要的免疫调节剂。

其余的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶构成了第二和第三亚族。

这些酶在导致细胞凋亡的细胞内信号传导途径中是非常重要的。一个亚族由涉及细胞凋亡途径中的起始事件(包括从浆膜传导信号)的酶组成。该亚族的成员包括天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-2、8、9和10。另一个亚族由效应物天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3、6和7组成,它与导致细胞通过细胞凋亡发生系统性破坏和死亡的最终的下stream裂解事件有关。涉及上游信号传导的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶可以激活下游的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶,后者可以阻断DNA修复机制、断裂DNA、分解细胞骨架并最终使细胞碎裂。

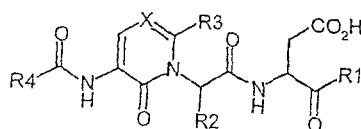
对于天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶主要识别的四种氨基酸序列的了解已被用于设计天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂。已制备出了结构为 $\text{CH}_3\text{CO}-[\text{P4}]-[\text{P3}]-[\text{P2}]-\text{CH}(\text{R})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 的可逆的四肽抑制剂,其中P2至P4表示最佳的氨基酸识别序列,R是可与天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的半胱氨酸巯基结合的醛、腓或酮。Rano和Thornberry, *Chem. Biol.* 4, 149-155 (1997); Mjalli, 等, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 3, 2689-2692 (1993); Nicholson 等, *Nature* 376, 37-43 (1995)。还制备出了基于类似的四肽识别序列的不可逆抑制剂,其中R是酰氧基甲基酮- $\text{COCH}_2\text{OCOR}'$, R'的例子是选择性取代的苯基(例如2,6-二氯苯甲酰氧基)以及其中R是 COCH_2X , 其中的X是离去基(例如F或Cl)。Thornberry等, *Biochemistry* 33, 3934 (1994); Dollé等, *J. Med. Chem.* 37, 563-564 (1994)。

已经用肽类的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂证实了天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂用于治疗与细胞凋亡增加有关的各种哺乳动物疾病状态的用途。例如,在啮齿动物模型中,已证实天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂可以减少梗塞面积并抑制心肌梗塞后心肌细胞的细胞凋亡,减轻由中风引起的损伤程度和神经病学缺陷,减少创伤性脑损伤中的创伤后细胞凋亡和神经病学缺陷,可有效地治疗暴发性肝破坏以及改善内毒素性休克后的存活率。Yaoita 等, *Circulation*, 97, 276 (1998); Endres 等, *J. Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 18, 238, (1998); Cheng 等, *J. Clin. Invest.*,

101, 1992 (1998); Yakovlev 等, J Neuroscience, 17, 7415 (1997); Rodriguez 等, J. Exp. Med., 184, 2067 (1996); Grobmyer 等, Mol. Med., 5, 585 (1999)。

总的来说, 以上描述的肽类抑制剂对于某些天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶是非常有效的。但是, 该效力并不总能反映在细胞凋亡的细胞模型上。此外, 肽抑制剂通常具有不很理想的药理学性质, 例如口服吸收差、稳定性差以及代谢迅速等。Plattner 和 Norbeck, Drug Discovery Technologies, Clark 和 Moos 编 (Ellis Horwood, Chichester, England, 1990)。

在认识到了需要改善肽类天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂的药理学性质后, 出现了肽模拟抑制剂。其中, 将其中的 P3 氨基酸用 3-氨基吡啶-2-酮和 5-氨基嘧啶-4-酮衍生物代替的抑制剂受到了大量的关注 (US 专利 5,756,466 (Bemis 等); Dolle 等 J. Med. Chem. 39, 2438, (1996); Golec 等 Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, 2181, (1997); Semple 等, Bioorg. Med. Chem. Lett. 7, 1337, (1997)), 导致产生了如下通式的化合物:

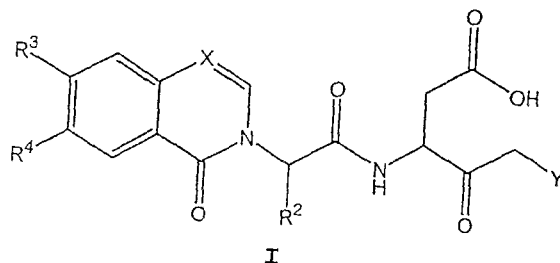


其中 R^1 - R^4 以及 X 是各种基团。

由于肽类抑制剂所固有的问题, 一直需要有效、稳定并且能穿透膜的小分子、非肽类的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂以在体内提供对细胞凋亡的有效的抑制作用。该化合物在治疗与天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶有关的上述疾病中极为有用。WO 01/42216 公开了天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂和其用途。本发明在 WO 01/42216 的公开内容基础上提供选择。

发明内容

本发明提供式 I 的化合物：



其中：

X 是 CH 或 N；

Y 是卤素，三氟苯氧基，或四氟苯氧基；

R² 是 C₁₋₆ 直链或支链烷基；

R³ 是氢，卤素，OCF₃，CN，或 CF₃；

R⁴ 是氢，卤素，OCF₃，SR，CN，CF₃，Ar，或 T-Ar；

其中：

T 是 O 或 S；

R 是 C₁₋₆ 直链或支链烷基；

Ar 是任选被 1-3 个选自卤素、CH₃、CF₃、CN、OMe、OCF₃、和 NR⁵R⁶ 的基团取代的苯环；

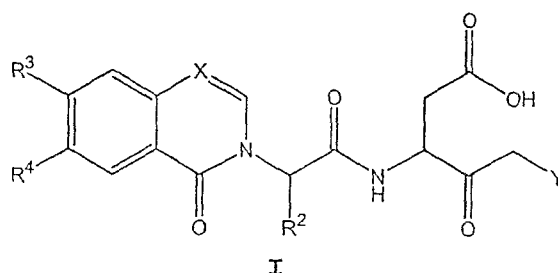
R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为 H 或 C₁₋₆ 烷基，或者 R⁵ 和 R⁶ 合起来形成任选含最多 3 个选自 O、S、NH、和 N(C₁₋₆ 烷基) 的杂原子的 5-7 元环；

条件是，当 Y 是卤素时，R³ 和 R⁴ 两者不同时为氢。

本发明也提供药物组合物和使用这种组合物治疗天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶介导的疾病的方法。

发明详述

本发明提供式 I 的化合物：



其中:

X 是 CH 或 N;

Y 是卤素, 三氟苯氧基, 或四氟苯氧基;

R² 是 C₁₋₆ 直链或支链烷基;

R³ 是氢, 卤素, OCF₃, CN, 或 CF₃;

R⁴ 是氢, 卤素, OCF₃, SR, CN, CF₃, Ar, 或 T-Ar;

其中:

T 是 O 或 S;

R 是 C₁₋₆ 直链或支链烷基;

Ar 是任选被 1-3 个选自卤素、CH₃、CF₃、CN、OMe、OCF₃、和 NR⁵R⁶ 的基团取代的苯环;

R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为 H 或 C₁₋₆ 直链或支链烷基, 或者 R⁵ 和 R⁶ 合起来形成任选含最多 3 个选自 O、S、NH、和 N(C₁₋₆ 直链或支链烷基) 的杂原子的 5-7 元环;

条件是, 当 Y 是卤素时, R³ 和 R⁴ 两者不同时为氢。

在式 I 的另一个实施方案中, R⁴ 是氢, 卤素, OCF₃, CN, CF₃, 或 T-Ar; 其中 T、Ar、和其他可变量定义如上。

本发明的化合物代表在国际 PCT 出版物 W001/42216 范围内的选择, 在此引入其全部公开内容。具体地说, 本发明的化合物具有出乎意外和令人惊讶的抑制细胞凋亡和/或抑制活化细胞释放 IL-1β 的能力。

根据一个优选实施方案, 式 I 中 R² 是乙基, 正丙基, 或异丙基。

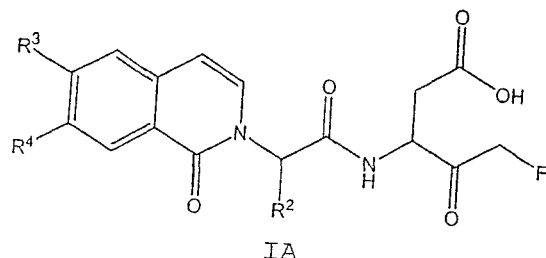
根据更优选的实施方案, 式 I 中 R² 是乙基。

根据更加优选的实施方案, 式 I 中 R² 是 (S)-乙基。

根据一个优选实施方案，式 I 中 R^3 是氢。

根据一个优选实施方案，式 I 中 Y 是 F，三氟苯氧基，或四氟苯氧基。

根据另一个优选实施方案，本发明提供式 IA 的化合物：



其中：

R^2 是乙基，正丙基，或异丙基；

R^3 和 R^4 彼此独立地是氢，卤素， OCF_3 ，CN， CF_3 ，或 Ar，条件是 R^3 和 R^4 两者不同时为氢；

Ar 是任选被 1-3 个选自卤素、 CH_3 、 CF_3 、CN、OMe、 OCF_3 、和 NR^5R^6 的基团取代的苯环； R^5 和 R^6 各自独立地为 H 或 C_{1-6} 直链或支链烷基，或者 R^5 和 R^6 合起来形成任选含最多 3 个选自 O、S、NH、和 N(C_{1-6} 直链或支链烷基)的杂原子的 5-7 元环。

根据式 IA 的另一个实施方案， R^3 和 R^4 彼此独立地是氢，卤素， OCF_3 ，CN，或 CF_3 ，条件是 R^3 和 R^4 两者不同时为氢； R^2 的定义如上对于式 IA 的定义。

根据一个优选实施方案，式 IA 的化合物中 R^2 是乙基。

根据更加优选的实施方案，式 IA 中 R^2 是 (S)-乙基。

根据另一个优选实施方案，式 IA 的化合物中 R^2 是异丙基。

根据一个优选实施方案，式 IA 的化合物中 R^3 是氢。

根据一个优选实施方案，式 IA 的化合物中 R^4 是 F，Cl，CN，Ar，或 CF_3 。

根据更优选的实施方案，式 IA 的化合物中 R^4 是 Cl。

根据另一个更优选的实施方案，式 IA 的化合物中 R^4 是 CF_3 。

根据另一个优选实施方案，式 IA 的化合物中 R^3 是氢， R^4 是 F，Cl，

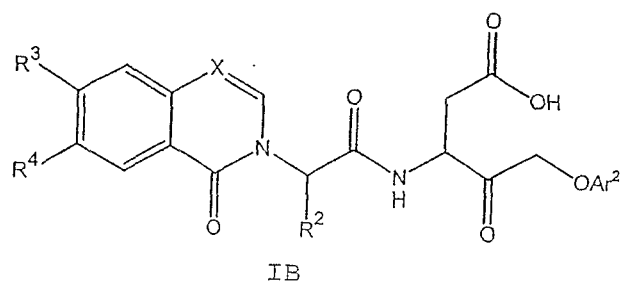
CN, Ar, 或 CF_3 。

根据另一个优选实施方案, 式 IA 的化合物中 R^3 是氢, R^4 是 Cl。

根据另一个优选实施方案, 式 IA 的化合物中 R^3 是氢, R^4 是 CF_3 。

根据另一个优选实施方案, 式 IA 的化合物中 R^3 是氢, R^4 是 Ar。

根据另一个优选实施方案, 本发明提供式 IB 的化合物:



其中:

X 是 CH 或 N;

R^2 是乙基, 正丙基, 或异丙基;

R^3 和 R^4 彼此独立地是氢, 卤素, OCF_3 , CN, 或 CF_3 ;

Ar^2 是三氟苯基或四氟苯基。

根据一个优选实施方案, 式 IB 的化合物中 Ar^2 是 2, 3, 5, 6-四氟苯基。

根据一个优选实施方案, 式 IB 的化合物中 R^2 是乙基。

根据更加优选的实施方案, 式 IB 中 R^2 是 (S)-乙基。

根据一个优选实施方案, 式 IB 的化合物中 X 是 CH。

根据一个优选实施方案, 式 IB 的化合物中 R^3 是氢。

根据一个优选实施方案, 式 IB 的化合物中 R^4 是 F, Cl, 或 CF_3 。

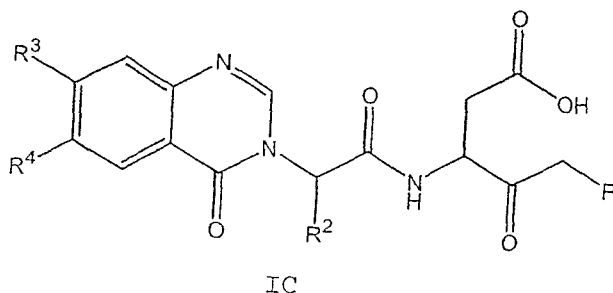
根据更优选的实施方案, 式 IB 的化合物中 R^4 是 Cl。

根据更优选的实施方案, 式 IB 的化合物中 R^4 是 CF_3 。

根据一个优选实施方案, 式 IB 的化合物中 R^3 是氢, R^4 是 F, Cl, 或 CF_3 。

根据另一个优选实施方案, 式 IB 的化合物中 Ar^2 是 2, 3, 5, 6-四氟苯基, R^3 是氢, R^4 是 Cl。

根据另一个优选实施方案，本发明提供式 IC 的化合物：



其中：

R^2 是乙基，正丙基，或异丙基；

R^3 是氢，卤素， OCF_3 ，CN，或 CF_3 ；

R^4 是卤素， OCF_3 ，CN， CF_3 ，SR，或 T-Ar；

T 是 O 或 S；

R 是 C_{1-6} 直链或支链烷基；

Ar 是任选被 1-3 个选自卤素、 CH_3 、 CF_3 、CN、OMe、 OCF_3 、和 NR^5R^6 的基团取代的苯环；

R^5 和 R^6 各自独立地为 H 或 C_{1-6} 直链或支链烷基，或者 R^5 和 R^6 合起来形成任选含最多 3 个选自 O、S、NH、和 N(C_{1-6} 直链或支链烷基)的杂原子的 5-7 元环。

根据式 IC 化合物的一个优选实施方案， R^4 是 T-Ar。

根据一个优选实施方案，式 IC 的化合物中 R^2 是乙基。

根据更加优选的实施方案，式 IC 中 R^2 是 (S)-乙基。

根据一个优选实施方案，式 IC 的化合物中 R^3 是氢。

根据一个优选实施方案，式 IC 的化合物中 R^4 是 F，Cl，CN，或 CF_3 。

根据更优选的实施方案，式 IC 的化合物中 R^4 是 Cl。

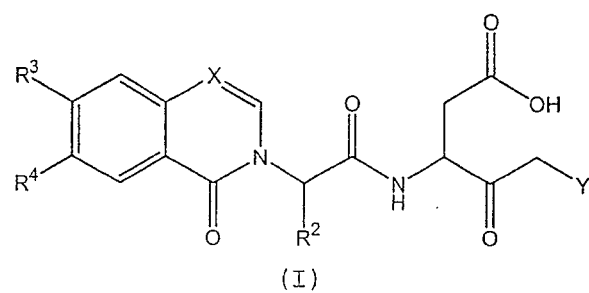
根据一个优选实施方案，式 IC 的化合物中 T 是 O。

根据一个优选实施方案，如果存在于式 IC 的化合物中的话，Ar 任选被 CF_3 或卤素取代 (优选，卤素是氯或氟)。

这里使用的 " C_{1-6} " 表示存在 1、2、3、4、5、或 6 个碳原子 (或任选取代其的杂原子)。

根据更优选的实施方案，本发明提供选自下表 1 的式 I 化合物：

表 1



实施例	R ⁴	R ³	R ²	Y	X
1	Cl	H	Et	F	CH
2	CF ₃	H	Et	F	CH
3	H	Cl	Et	F	CH
4	H	CF ₃	Et	F	CH
5	Cl	H	Et	2,3,5,6- 四氟苯氧基	N
6	H	H	Et	2,3,5,6- 四氟苯氧基	N
7	H	H	Et	2,4,6- 三氟苯氧基	N
8	H	H	Et	2,3,6- 三氟苯氧基	N
9	H	H	Et	2,3,5,6- 四氟苯氧基	CH
10	Cl	H	Et	2,3,5,6- 四氟苯氧基	CH

实施例	R ⁴	R ³	R ²	Y	X
11	Cl	Cl	Et	2,3,5,6- 四氟苯氧基	CH
12	2-氟苯氧基	H	Et	F	N
13	3-氟苯氧基	H	Et	F	N
14	3-氟苯氧基	H	Et	F	N
15	2,4- 二氟苯氧基	H	Et	F	N
16	苯基硫烷基	H	Et	F	N
17	3-氟苯基 硫烷基	H	Et	F	N
18	Cl	H	i-Pr	F	CH
19	CF ₃	H	Et	2,3,5,6- 四氟苯氧基	CH
20	CF ₃	H	Et	2,3,5,6- 四氟苯氧基	N
21	苯基	H	Et	F	CH
22	S(n-Pr)	H	Et	F	N

根据另一个实施方案，本发明提供药物组合物，其包括：

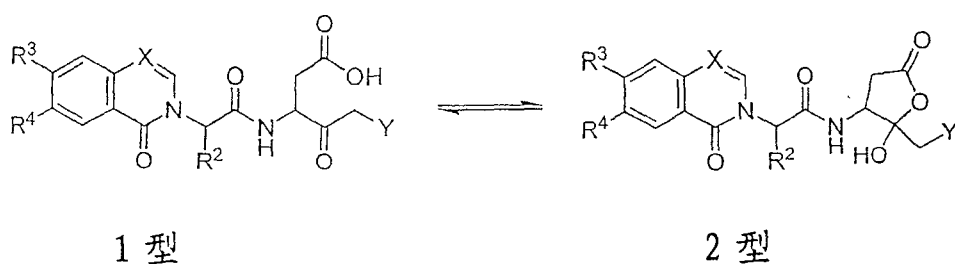
- a) 如上定义的式 I 的化合物，或其药学上可接受的盐；和
- b) 药学上可接受的载体，助剂或赋形剂。

根据一个优选实施方案，本发明的药物组合物包括：

- a) 式 IA、式 IB、或式 IC 的化合物；和
- b) 药学上可接受的载体，助剂或赋形剂。

根据更优选的实施方案，本发明的药物组合物包括选自上表 1 的化合物。

本发明的化合物可以以开链形式 1 或者环化半缩酮形式 2 的形式存在于溶液中。在这里，每一种异构形式的代表均意味着包括另一种异构形式。

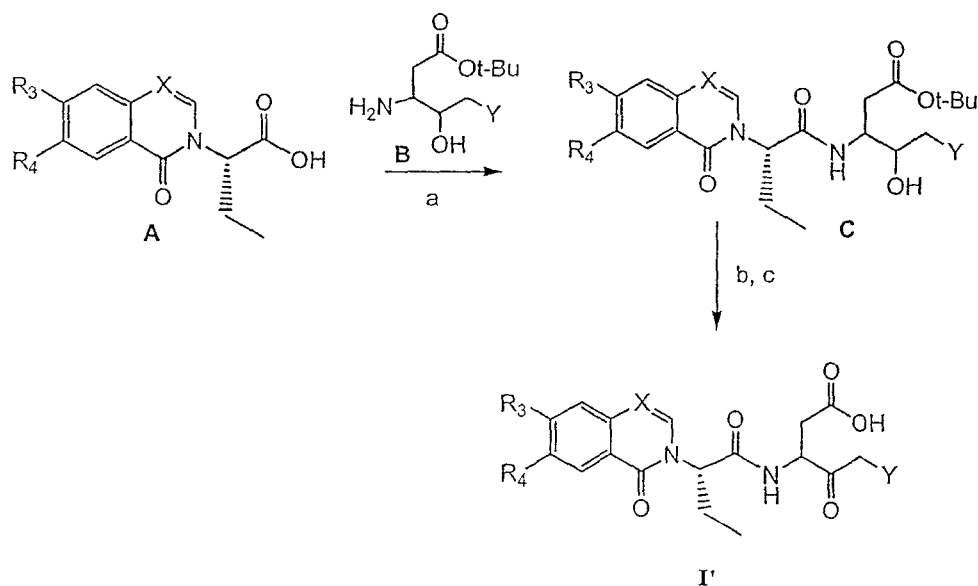


对本领域技术人员来说将显而易见的是，本发明的某些化合物可以以互变异构形式或水合形式存在，化合物的所有这些形式均在本发明的范围之内。

除非另有说明，在此描述的结构也意味着包括所述结构的所有立体化学形式；即，对于各个不对称中心来说的 R 和 S 构型。因此，本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映异构和非对映混合物均在本发明的范围之内。除非另有说明，在此描述的结构也意味着包括只在一个或多个同位素富集的原子存在下时有差别的化合物。例如，除了把氢置换为氘或氚或者把碳置换为 ^{13}C -或 ^{14}C -富集的碳以外，具有本发明结构的化合物均在本发明的范围之内。

一般说来，本发明的化合物可以通过本领域技术人员已知的用于类似化合物的方法制备。本发明化合物的合成路线在 W001/42216 中进行过一般性的描述。为了举例说明，提供用于合成本发明化合物的以下流程 I-IV。

流程图 I



试剂: (a) EDC/DMAP/HOBt/THF;

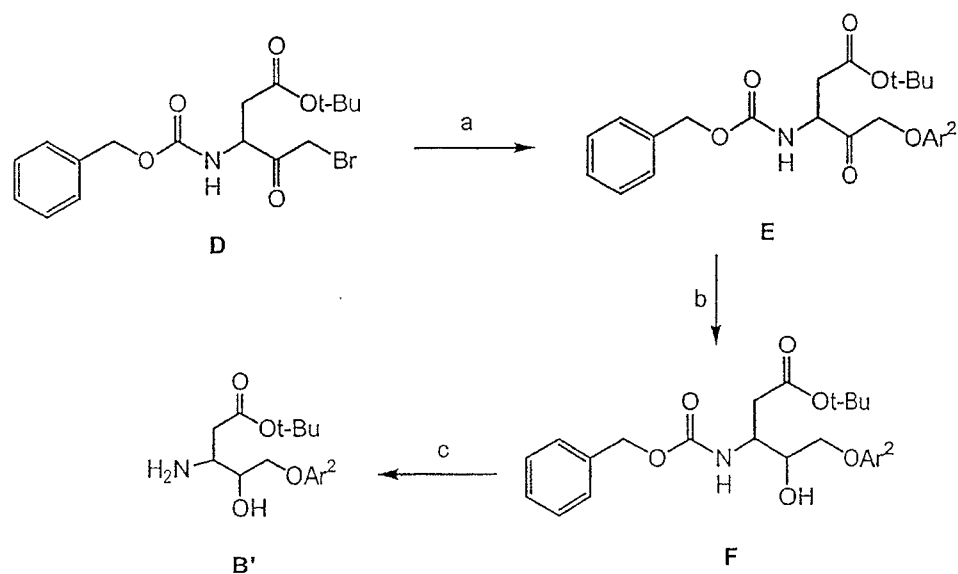
(b) Dess-Martin 过碘烷;

(c) TFA/DCM

在以上流程 I 中,使用以下缩写:EDC 是 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺; HOBt 是 1-羟基苯并三唑; THF 是四氢呋喃; TFA 是三氟乙酸; DCM 是二氯甲烷; DMAP 是 4-二甲基氨基吡啶。酸 A 与氨基醇 B 偶合形成酰胺 C。化合物 C 中的羟基被氧化得到酮,随后叔丁基酯发生酸水解,形成游离酸 I'。

在其中 CH₂Y 是 CH₂F 的氟甲基酮的情况下,氨基醇 B 可以根据 Revesz 等人的方法得到: Revesz 等人, Tetrahedron Lett., 35, 9693 (1994)。在其中 CH₂Y 中的 Y 是 2,3,5,6-四氟苯氧基、2,4,6-三氟苯氧基、或 2,3,6-三氟苯氧基的氟取代的苯氧基酮的情况下,氨基醇 B 可以用类似于 Semple 等人所述的方法得到, Semple 等人, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 7, 1337 (1997) (流程 II)。

流程图 II



试剂: (a) KF/DMF/ Ar^2OH ;

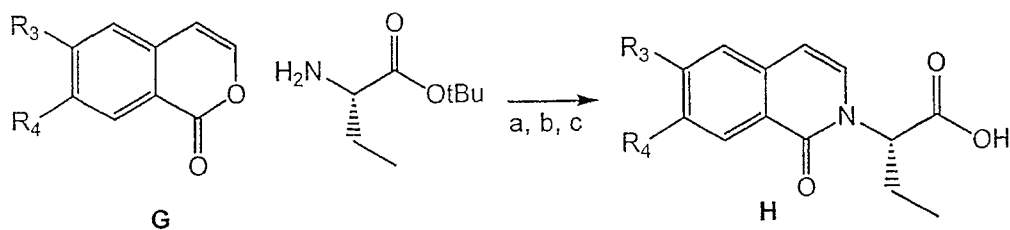
(b) NaBH_4 /THF;

(c) H_2 /Pd/C/MeOH

在以上流程 II 中, 使用以下缩写: KF 是氟化钾; DMF 是 N,N-二甲基甲酰胺; Ar^2OH 或者是 2,3,5,6-四氟苯酚、2,4,6-三氟苯酚或者是 2,3,6-三氟苯酚; THF 是四氢呋喃; MeOH 是甲醇。

市售的溴酮 D 与适当取代的氟苯酚和氟化钾反应, 得到苯氧基酮 E。然后, 用硼氢化钠将该酮还原, 得到醇 F, 该醇通过钯/碳催化剂加氢, 得到氨基醇 B' (Ar^2 =氟取代的苯基)。

流程图 III

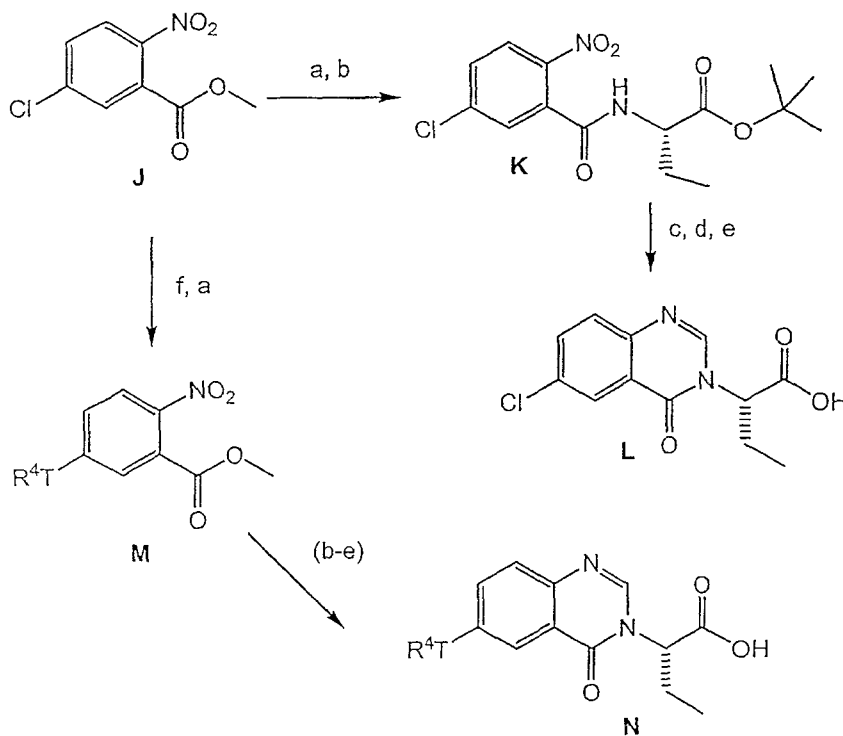


试剂: (a) 加热;
 (b) 浓 HCl/IPA;
 (c) TFA/DCM

在以上流程 III 中, 使用以下缩写: IPA 是异丙醇; TFA 是三氟乙酸, DCM 是二氯甲烷。

可以用流程图 III 所示的合成步骤制备手性形式的异喹啉-1-酮酸衍生物(式 I 中, X=C)。原料异香豆素 G 是通过类似于 Narasimhan 等人和 Margaretha 等人的方法制备的: Narasimhan 等人, *Synthesis*, 797 (1975) 和 Margaretha 等人, *Tetrahedron*, 56, 6763 (2000), 除非另有说明。异香豆素 G 首先与市售的 (S)-2-氨基丁酸叔丁基酯一起加热。所得的化合物再与浓盐酸在异丙醇中反应, 得到异喹啉-1-酮叔丁基酯, 对其用三氟乙酸脱保护得到酸 H。该酸之后与氨基醇 B 偶合(流程 I)。

流程图 IV

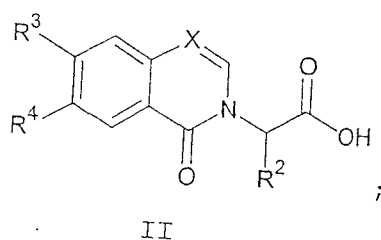


- 试剂: (a) LiOH/THF/H₂O;
 (b) (S)-2-氨基丁酸叔丁基酯/EDC/HOBt/DMAP/THF;
 (c) SnCl₂/MeOH;
 (d) 原甲酸三甲酯/AcOH/回流;
 (e) TFA/DCM;
 (f) R⁴-TH/K₂CO₃/DMF

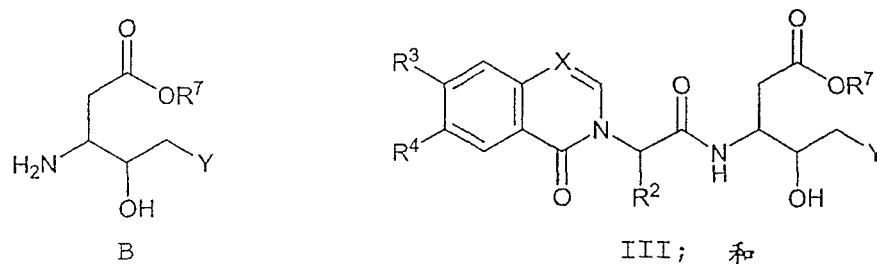
在以上流程 IV 中, 使用以下缩写: AcOH 是乙酸, R⁴-TH 可以是 2-氯苯酚, 3-氯苯酚, 3-氟苯酚, 或 2,4-二氯苯酚, 或苯硫酚或 3-氟苯硫酚。(4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)酸衍生物 A (X=N) 的手性形式是使用类似于 Makino 等人的方法制备的, Makino 等人, Synlett, 11, 1670 (2000)。可商购的 5-氯-2-硝基苯甲酸甲酯 J 用氢氧化锂水解成酸, 所得的酸再与可商购的 (S)-2-氨基丁酸叔丁基酯偶合, 形成酰胺 K。使用氯化锡(II)还原硝基, 随后用原甲酸三甲酯进行酸催化的环缩合, 得到喹唑啉, 用三氟乙酸对其脱保护, 形成 4-氧代-4H-喹唑啉-3-基酸 L。然后, 将该酸与氨基醇 B 偶合(流程图 I)。或者, 5-氯-2-硝基苯甲酸甲酯 J 可以与适当取代的酚或苯硫酚通过在 DMF 中与碳酸钾一起加热而反应, 得到相应的 6-苯氧基 (Y=O) 或 6-苯基硫烷基 (Y=S) 衍生物。对其用氢氧化锂进行处理, 得到酸 M, 对该酸可以进行进一步的处理(流程图 IV, 步骤 b-e), 得到 4-氧代-4H-喹唑啉-3-基酸 N, 此酸然后如先前所述与氨基醇 B 偶合。也可以以类似的方式对 2-硝基苯甲酸进行处理, 得到未取代的 4-氧代-4H-喹唑啉-3-基酸。

因此, 本发明的一个方面, 涉及制备式 I 化合物的一般方法, 其包括以下步骤:

使式 II 的酸或酸衍生物:



与式 B 的氨基醇反应，形成式 III 的化合物，



和将中间体 III 转化为化合物 I，其中： R^7 是适当的保护基，Y，X， R^2 ， R^3 ，和 R^4 如本发明任一实施方案中所述。适当的保护基对有经验的专业人员来说是公知的(如参见，"Protective Groups in Organic Synthesis"，第三版，Greene, T. W. 和 Wuts, P. G.，编，John Wiley & Sons, NewYork: 1999，其全部内容在此引入作为参考)。优选 R^7 是 C_{1-6} 直链或支链烷基。更优选， R^7 是叔丁基。

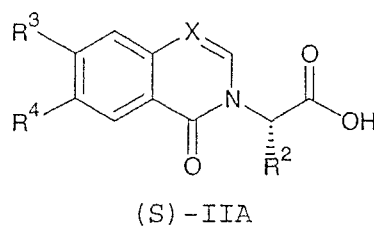
式 II 的化合物和式 B 的化合物可以在用于使氨基化合物和酸化合物偶合的任何条件下反应。这种条件对有经验的专业人员来说是众所周知的。优选的偶合条件参见本发明的流程图和实施例。

式 III 的化合物可以在用于将羟基转化为羰基和将受保护的酸转化为游离酸的任何条件下转化为式 I 的化合物。这种条件对有经验的专业人员来说是众所周知的。优选用于由羟基制备羰基的条件是本发明流程图和实施例中描述的氧化条件。当 R^7 是叔丁基时，用于把受保护的酸脱保护的优选条件是本发明中流程图和实施例中描述的水解条件。

该方法尤其可用于制备本发明的手性化合物，其中带有 R^2 取代基的碳富立体化学。如下文举例说明(例如参见，实施例 1-22)的那样，可以以手性的形式获得式 II 的中间体酸或酸衍生物。在本发明中，例如，其中 X 是氮的喹唑啉-4-酮(例如参见，实施例 5-8，12-18，20，和 22)和其中 X 是 CH 的异喹啉-1-酮(参见例如，实施例 1-4，9-11，

19, 和 21)。II 和 B 偶合形成 III 的反应可以根据任何适当的方法进行。将 III 转化为 I 可以如本发明中所述或者根据本领域技术人员熟知的其他方法进行。

某些式 II 的手性中间体可用于制备本发明化合物的过程中。优选的中间体由化合物 IIA 表示：



其中 X、R²、R³、和 R⁴ 如本发明任何实施方案中所述。

根据对于式 II 和 IIA 化合物的更优选的实施方案，R² 是乙基或异丙基。

对本发明的化合物，可以测定其抑制细胞凋亡的能力、IL-1β 的释放或直接测定其天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶活性。用于每一活性的试验在本领域中都是已知的，具体内容参见实施例 23-25。

如果在这些组合物中使用本发明化合物的可药用盐，这些盐优选是从无机或有机酸和碱衍生的盐。所述的酸盐包括：乙酸盐、己二酸盐、藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐 (digluconate)、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、苦味酸盐、新戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐和十一酸盐。碱盐包括铵盐、碱金属盐例如钠和钾盐、碱土金属盐例如钙和镁盐，与有机碱的盐例如二环己基胺盐、N-甲基-D-葡萄糖胺盐以及与氨基酸例如精氨酸、赖氨酸等形成的盐。

此外，碱性的含氮基团可以用一些试剂季铵化，如：低级烷基卤化物例如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物；硫酸二烷基酯例如硫酸二甲酯、二乙酯、二丁酯和二戊酯；长链卤化物例如癸基、十二烷基、肉豆蔻基和硬脂基氯化物、溴化物和碘化物；芳烷基卤化物例如苄基和苯乙基溴化物等。由此制得可溶解或分散于水或油中的产物。

本发明的组合物和方法中所用的化合物还可以通过增加适宜的功能基来进行修饰，以提高其选择性的生物学活性。这些修饰是本领域已知的，包括增加向指定的生物学系统(例如血液、淋巴系统、中枢神经系统)中的生物学渗透性、增加口服生物利用度、增加溶解度从而能够通过注射给药、改变代谢以及改变排泄速率。

可用于这些组合物的可药用载体包括但不限于，离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白例如人血清白蛋白、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质例如硫酸钾、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素类物质、聚乙二醇、羧基甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛蜡。

根据一个优选的实施方案，本发明的组合物被配制成用于向哺乳动物、优选人类给药。

本发明的这些药物组合物可以口服、胃肠外、通过吸入喷雾、局部、直肠、经鼻、颊部、阴道或通过植入的储库给药。本文所用的术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内、鞘内、肝内和颅内注射或输注技术。优选将组合物口服或静脉内给药。

本发明组合物的无菌可注射形式可以是含水或油性的混悬液。这些混悬液可以按照本领域已知的技术用适宜的分散剂或湿润剂以及助悬剂配制。无菌可注射制剂还可以是在无毒的胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射溶液或混悬液，例如在1,3-丁二醇中的溶液。可以使用的可接受的赋形剂和溶剂是水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶

液。此外，通常用无菌的不挥发油作为溶剂或悬浮介质。为此，可以使用任何温和的不挥发油，包括合成的单或二甘油酯。脂肪酸例如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备可注射制剂，也可使用天然的可药用油例如橄榄油或蓖麻油、特别是其聚氧乙基化的形式。这些油溶液或混悬液还含有长链的醇稀释剂或赋形剂，例如羧基甲基纤维素或常用于配制可药用剂型、包括乳液和混悬液的类似分散剂。其它常用的表面活性剂例如 Tweens、Spans 和其它常用于生产可药用固体、液体或其它剂型的乳化剂或生物利用度促进剂也可用于制备制剂的目的。

本发明的药物组合物可以以任何可口服的剂型口服给药，包括但不限于胶囊、片剂、含水混悬液或溶液。对于口服使用的片剂，常用的载体包括乳糖和玉米淀粉。润滑剂例如硬脂酸镁也经常使用。对于胶囊形式的口服给药，可以使用的稀释剂包括乳糖和干燥的玉米淀粉。当需要用含水混悬液进行口服给药时，可将活性成分与乳化剂或助悬剂混合。如需要，还可加入某些甜味剂、矫味剂或着色剂。

或者，可将本发明的药物组合物以栓剂的形式用于直肠给药。所述栓剂可以通过将药物与适宜的非刺激性的赋形剂混合物进行制备，所述赋形剂在室温下是固体但在直肠温度下是液体，因此可以在直肠中融化而释放出药物。这些材料包括可可脂、蜂蜡和聚乙二醇。

本发明的药物组合物还可以局部给药，特别是当治疗靶点包括易于通过局部涂抹而达到的区域或器官时，包括眼、皮肤或肠道下部的疾病。适用于这些区域和器官的局部制剂很容易制备。

对于肠道下部的局部应用可以通过直肠栓剂(见上)或适宜的灌肠制剂的形式进行。也可以使用局部经皮贴剂。

对于局部应用，可将药物组合物配制成含有悬浮或溶解在一种或多种载体中的活性成分的适宜软膏。用于本发明化合物局部给药的载体包括但不限于，矿物油、液体矿脂、白凡士林、丙二醇、聚氧乙烯、聚氧丙烯化合物、乳化用蜡和水。或者，可将药物组合物配制成含有悬浮或溶解在一种或多种可药用载体中的活性成分的适宜的洗剂或霜剂。适宜的载体包括但不限于，矿物油、脱水山梨醇一硬脂酸

酯、聚山梨酯 60、鲸蜡基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苧醇和水。

对于眼部应用，可将药物组合物配制成在等渗的、调节过 pH 值的盐水中的微粉化的混悬液形式，或者，优选是在等渗的、调节过 pH 值的盐水中的溶液形式，其中可以不含或含有防腐剂例如氯苧烷铵。或者，对于眼部应用，可将药物组合物配制成软膏例如凡士林的形式。

本发明的药物组合物还可以通过鼻气雾剂或吸入剂给药。这些组合物可以按照药物制剂领域公知的技术制备，并可用苧醇或其它适宜的防腐剂、用于提高生物利用度的吸收促进剂、氟化碳和/或其它常规的增溶剂或分散剂制备成在盐水中的溶液的形式。

上述组合物特别适用于涉及如下疾病的治疗应用：IL-1 介导的疾病、细胞凋亡介导的疾病、炎症性疾病、自身免疫疾病、破坏性骨疾病、增殖性疾病、传染性疾病、变性疾病、与细胞死亡有关的疾病、过度饮酒、病毒介导的疾病、视网膜疾病、眼色素层炎、炎症性腹膜炎、骨关节炎、胰腺炎、哮喘、成人呼吸窘迫综合征、肾小球性肾炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、慢性甲状腺炎、格累夫斯氏病、自身免疫性胃炎、糖尿病、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性中性白细胞减少症、血小板减少症、慢性活动性肝炎、重症肌无力、炎症性肠疾病、节段性回肠炎、牛皮癣、特应性皮炎、疤痕形成、移植物对抗宿主的疾病、器官移植排斥反应、烧伤后的器官细胞凋亡、骨质疏松、白血病和相关疾病、骨髓发育不良综合征、多发性骨髓瘤-相关性骨疾病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、转移性黑瘤、卡波济氏肉瘤、多发性骨髓瘤、出血性休克、脓毒病、脓毒性休克、烧伤、志贺氏菌病、早老性痴呆、帕金森氏症、杭廷顿氏舞蹈症、肯尼迪氏疾病、朊病毒疾病、脑局部缺血、癫痫、心肌缺血、急性和慢性心脏病、心肌梗塞、充血性心衰、动脉粥样硬化、冠状动脉旁路移植术、脊柱肌肉萎缩、肌萎缩性侧索硬化、多发性硬化、HIV-相关性脑炎、衰老、脱发、中风引起的神经病性损伤、溃疡性结肠炎、创伤性脑损伤、脊髓损伤、乙型肝炎、丙型肝炎、庚型肝炎、黄热病、登

革热或日本脑炎、各种形式的肝脏疾病、肾脏疾病、多囊性肾疾病、与幽门螺旋杆菌有关的胃和十二指肠溃疡、HIV 感染、结核病和脑膜炎。所述化合物和组合物还可用于治疗与冠状动脉旁路移植术有关的并发症。上述组合物中的化合物含量应足以在通过实施例中所描述的任何试验测量时产生可观察到的疾病严重程度或天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶活性的下降和/或细胞凋亡的减少。

根据另一个实施方案，本发明的组合物还可以含有其它治疗剂。所述治疗剂包括但不限于，溶解血栓的药物例如组织纤溶酶原激活物和链激酶。当使用第二种药物时，可将第二种药物以独立的剂量形式给药，或作为与本发明化合物或组合物的单一剂量形式的一部分给药。所述化合物与另外的药剂两者的剂量浓度都应当是单一疗法中通用给药量的 10-100%，更优选约 10-80%。

还应当理解，对于任何特定患者的具体剂量和治疗方案取决于各种因素，包括所用的具体化合物的活性、年龄、体重、一般健康情况、性别、饮食、给药时间、排泄速率、药物联用、以及主治医师的判断和所治疗的具体疾病的严重程度。活性成分的量还取决于组合物中的具体化合物和其它治疗剂(如果存在的话)。

在某些实施方案中，本发明的化合物可以经口或肠道外给药，为了达到所需的治疗效果，剂量为每天约 0.01 毫克/千克-约 50 毫克/千克患者体重，优选约 1 毫克/千克-约 25 毫克/千克患者体重，每天给药一次或多次。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了对患有上述疾病之一的哺乳动物进行治疗的方法，该方法包括向所述哺乳动物施用上述可药用组合物的步骤。在该实施方案中，如果还向患者施用其它治疗剂或天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂，可将其与本发明的化合物一起以单一的剂型给药，或者将其作为独立的剂型给药。当以独立的剂型给药时，可将其它天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂或药物在施用含有本发明化合物的可药用组合物之前、同时或之后给药。

本发明的化合物或其药学上可接受的组合物也可以引入到用于涂

渍可植入的医疗器械，如假肢、人工瓣膜、脉管移植物、斯坦特固定模和导管的组合物中。因此，本发明在另一方面，包括用于涂渍可植入的器械的组合物，其包括以上概述的在这里所列大类与亚类中的本发明化合物，和适合于涂渍所述可植入器械的载体。再一方面，本发明包括涂有一种组合物的可植入器械，所述组合物包括以上概述的在这里所列大类与亚类中的本发明化合物，和适合于涂渍所述可植入器械的载体。

本发明的另一方面，涉及在生物样品或患者中抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶活性的方法，该方法包括给予患者式 I 的化合物或含有所述化合物的组合物，或者将所述生物样品与式 I 的化合物或含有所述化合物的组合物接触。这里使用的术语"生物样品"，包括但不限于细胞培养物或者其提取物；得自哺乳动物的活组织检查物质或其提取物；以及血液，唾液，尿，粪便，精液，泪，或其他体液或其提取物。

在生物样品中抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶活性可用于许多本领域技术人员公知的目的。这种目的的实施例包括但是不局限于，输血，器官移植，生物标本储存，和生物检定。

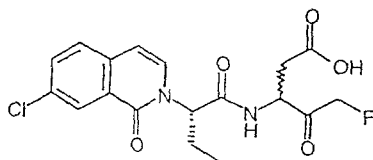
本发明的化合物可用于保藏细胞，如可能需要器官移植的细胞的方法中，或者用于保藏血液制品。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂的类似的用途参见 (Schierle 等人, Nature Medicine, 5, 97 (1999))。所述方法涉及用含有天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂的溶液处理要进行保藏的细胞或者组织。所需天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制剂的量将取决于抑制剂对于所给细胞类型的有效性和从 apoptotic 细胞死亡起保藏细胞所需的持续时间。

具体实施方式

为了更全面地理解本发明，描述了如下制备和试验实施例。这些实施例的目的仅仅是为了说明，并不以任何方式对本发明的范围构成限定。

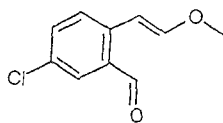
实施例 1:

(S)-3-[2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸



方法 A:

5-氯-2-(2-甲氧基乙烯基)-苯甲酸



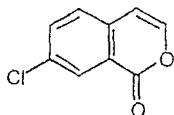
向冷却的 (0℃) 甲氧基甲基三苯基膦氯化物 (39g) 在乙醚 (200ml) 和叔丁醇 (50ml) 混合物中形成的浆液中分步加入叔丁醇钾 (12.8g)。所得混合物在 0℃ 下搅拌 1 小时，然后在 15 分钟内滴加 2-甲酰基-5-氯苯甲酸 (根据 J. Org. Chem., 61, 3402 (1996)) 制备) (10g) 的乙醚 (50ml) 溶液。所得混合物在 0℃ 下搅拌 1 小时，然后升温到室温并另外搅拌 90 分钟。混合物用水 (200ml) 稀释，除去有机相。水相用 1M HCl 酸化到 pH 值=1，并用乙酸乙酯 (3x50ml) 萃取。合并的萃取液用盐水洗涤，干燥 (硫酸镁)，过滤和浓缩。残余物通过急骤层析纯化 (50% 的乙酸乙酯/己烷)，得到副标题化合物，黄色固体 (9.13g, 80%)。

¹H NMR

(400MHz, CDCl₃) δ 3.70-3.81 (3H, s), 6.20 (0.3H, d, *cis* 烯), 6.30 (0.3H, d, *cis* 烯), 6.80 (0.7H, d, *trans* 烯), 7.01 (0.7H, d, *trans* 烯), 7.30-8.15 (3H, m) ppm.

方法 B:

7-氯-异苯并吡喃-1-酮



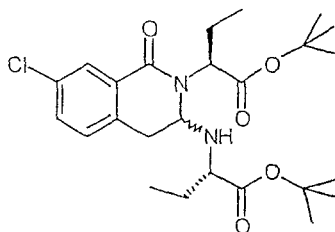
在 0℃ 下将浓硫酸 (15ml) 加入到 5-氯-2-(2-甲氧基乙烯基)-苯甲酸 (4.43g) 中。混合物搅拌 2 小时，然后用冰/水稀释。产物用乙酸乙酯 (3x15ml) 萃取，合并的萃取液用饱和碳酸氢钠溶液洗涤。溶液经干燥 (硫酸镁)，过滤和浓缩。残余物通过急骤层析纯化 (0-5% 的乙酸乙酯/己烷)，得到副标题化合物，白色固体 (3.04g, 81%)。

mp 109.8-110.9°C. ¹H NMR

(400MHz, CDCl₃) δ 6.51 (1H, d), 7.28-7.32 (1H, m), 7.41 (1H, d), 7.64-7.70 (1H, m), 8.28 (1H, m) ppm.

方法 C:

(S)-2-[3-(1-叔丁氧基羰基-丙基氨基)-7-氯-1-氧代-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基]-丁酸叔丁基酯



将 7-氯-异苯并吡喃-1-酮 (10g) 和 (S)-2-氨基丁酸叔丁基酯 (22g) 的混合物在 85℃ 加热 24 小时。然后，将混合物冷却并通过急骤层析

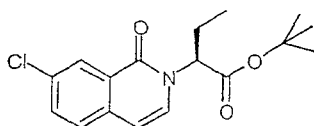
纯化(5-25%的乙酸乙酯/己烷),得到副标题化合物,黄色油状物(17.1g, 64%)。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 0.68-

1.32 (6H, m), 1.50 (21H, m), 1.92 (1H, m), 2.15 (1H, m),
2.82-3.40 (3H, m), 4.41 (1H, m), 4.68 (1H, m), 7.11 (1H,
m), 7.35-7.52 (1H, m), 8.05 (1H, m) ppm.

方法 D:

(S)-2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸叔丁基酯

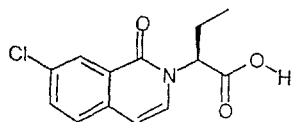


在 0℃下,向搅拌的 2-[3-(1-叔丁氧基羰基-丙基氨基)-7-氯-1-氧代-3,4-二氢-1H-异喹啉-2-基]-丁酸叔丁基酯(8.58g)的异丙醇(180ml)溶液中加入浓盐酸(20ml)。使得所得混合物升温至室温,并搅拌 18 小时。然后将混合物用乙酸乙酯(500ml)和水(150ml)稀释。分离有机相并先用水、然后用盐水洗涤,干燥(硫酸镁),过滤和浓缩。得到副标题产物,黄色固体(5.57g, 97%)。

m.p. 111.3-111.8℃; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -52.3^{\circ}$ (c=1, CHCl_3); IR (固体) 1731.4, 1649.5, 1593.2, 1229.6, 1152.8, 901.9 cm^{-1} ; ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 0.95 (3H, t), 1.48 (9H, s), 1.95 (1H, m), 2.30 (1H, m), 5.55 (1H, m), 6.40 (1H, m), 7.15 (1H, m), 7.49 (1H, m), 7.61 (1H, m), 8.40 (1H, m) ppm; ^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3) δ 10.9, 24.8, 28.1, 59.2, 82.8, 105.7, 127.3, 127.8, 128.1, 129.5, 133.1, 133.2, 135.4, 161.8, 170.2; MS ES(+) 322.4 (M+H).

方法 E:

(S)-2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸

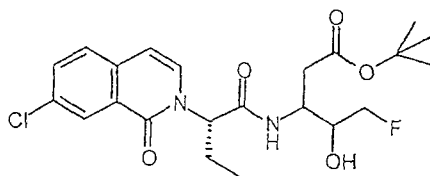


将(S)-2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸叔丁基酯(322mg)的二氯甲烷(14ml)溶液冷却到 0℃。加入三氟乙酸(3.5ml),并使所得混合物升温至室温,搅拌 2 小时。然后将混合物减压浓缩,残余物再溶于二氯甲烷中。这一过程重复若干次以除去过量的三氟乙酸。所得固体在乙醚中成浆,过滤并用更多的乙醚洗涤。然后将固体真空干燥至恒重。得到副标题产物同,白色固体(236mg, 89%) m.p.

159.6-160.1℃; $[\alpha]^{24}_D -47.0^0$ (c=1.01, CHCl₃); IR (固体)
1731.4, 1639.3, 1577.8, 1209.1, 1168.1 cm⁻¹; ¹H NMR
(400MHz, d₆-DMSO) δ 0.82 (3H, t), 2.00-2.25 (2H, m), 5.20
(1H, m), 6.70 (1H, d), 7.49 (1H, d), 7.70-7.81 (2H, m),
8.18 (1H, s) ppm; ¹³C NMR (100MHz, d₆-DMSO) δ 10.8, 22.7,
60.8, 104.9, 126.5, 126.6, 128.8, 131.6, 132.5, 133.1,
135.8, 160.5, 171.7; MS ES (+) 266.27 (M+H).

方法 F:

(S)-3-[2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-羟基戊酸叔丁基酯



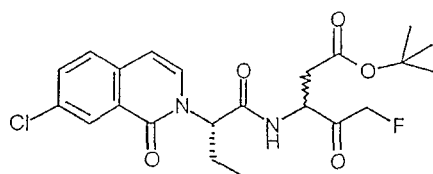
将搅拌的(S)-2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸(15g), 3-氨基-5-氟-4-羟基戊酸叔丁基酯(如 Tetrahedron Lett., 35, 9693(1994)中所述制备)(12.9g), HOBt(8.4g), DMAP(7.2g)和 THF(450ml)的混合物冷却到 0℃, 然后加入 EDC(11.9g)。使得混合物在 16 小时内升温至室温, 然后减压浓缩。残余物通过急骤层析纯化(30-60%醋酸乙酯/己烷), 得到副标题化合物, 白色泡沫状物(24.6g, 96%)。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 0.92 (3H, m), 1.13-1.50 (9H, m), 1.95 (1H, m), 2.25 (1H, m), 2.45-2.78 (2H, m), 3.68-4.60 (5H, m), 5.50 (1H, m), 6.60 (1H, m), 7.21-7.60 (4H, m), 8.20-8.31 (1H, m) ppm; ^{19}F NMR (376MHz, CDCl_3)

(质子去偶的) δ -229.6, -229.7, -230.5, -230.6.

方法 G:

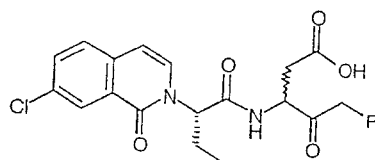
(S)-3-[2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸叔丁基酯



在 0℃下, 对搅拌的 3-[2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-羟基戊酸叔丁基酯(47.8g)的无水 DCM(1.2 升)溶液用 1,1,1-三乙酰氧基-1,1-二氢-1,2-benziodoxol-3(1H)-酮(53.5g))进行处理。所得混合物在 0℃保存 2 小时, 用乙酸乙酯稀释, 然后倾入到 1:1 的饱和碳酸氢钠水溶液和饱和硫代硫酸钠水溶液混合物中。除去有机层, 水层再用乙酸乙酯萃取。合并的有机萃取液经干燥(硫酸镁), 过滤和浓缩。残余物通过急骤层析纯化(20-40%的乙酸乙酯/己烷), 得到副标题化合物, 白色固体(41.9g, 88%)。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 1.00 (3H, t), 1.29 (5H, s), 1.41 (4H, s), 2.01 (1H, m), 2.29 (1H, m), 2.61-3.05 (2H, m), 4.77 (3H, m), 5.50 (1H, m), 6.60 (1H, m), 7.20-7.34 (2H, m), 7.51 (1H, m), 7.62 (1H, m), 8.41 (1H, m) ppm; ^{19}F NMR (376MHz, CDCl_3) (质子去偶的) δ -231.89, -232.30.

(S)-3-[2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸

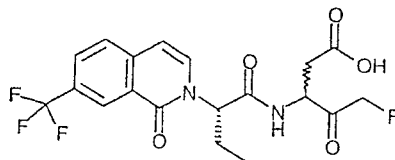


使用类似于方法 E 中所述的方法制备, 产物经分离为白色固体 (98%)。

IR (固体) 1782.7, 1741.7, 1644.4, 1593.2, 1536.8, 1209.1, 1168.1, 1055.5, 840.4 cm^{-1} ; ^1H NMR (400MHz, d_6 -DMSO) δ 0.82 (3H, m), 1.81-2.25 (2H, m), 2.25-3.11 (2H, m), 4.15-5.60 (4H, m), 6.70 (1H, m), 7.55 (1H, m), 7.78 (2H, m), 8.15 (1H, s), 8.35-9.00 (1H, brm) ppm; ^{13}C NMR (100MHz, d_6 -DMSO) δ 10.6, 23.0, 24.0, 24.6, 32.9, 34.6, 34.7, 47.7, 52.2, 52.3, 58.2, 58.23, 58.7, 59.1, 83.4, 83.5, 85.2, 85.3, 103.9, 104.5, 104.7, 104.8, 126.5, 126.6, 128.8, 131.3, 131.4, 131., 133.1, 135.7, 135.73, 160.8, 170.2, 170.3, 170.4, 172.0, 173.1, 202.6, 202.7; ^{19}F NMR (376MHz, d_6 -DMSO) (质子去偶的) δ -226.70, -226.75, -227.51, -230.5, -231.16, -232.61, -232.67, -233.37; MS ES (-) 395.33 (M-H).

实施例 2:

(S)-3-[2-(7-三氟甲基-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸

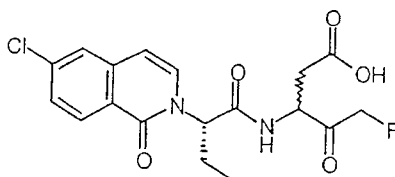


这是使用类似于方法 A-G 中所述的方法制备的(2-甲酰基-5-三氟甲基苯甲酸是使用类似于 J. Org. Chem., 61, 3402(1996)中所述的方法制备的)。产物经分离, 为白色固体(93%, 最后一步)。

IR (固体) 1782.6, 1746.8, 1644.4, 1629.0, 1603.4, 1321.8, 1275.7, 1168.1, 1127.2, 927.5 cm^{-1} ; ^1H NMR (400MHz, d_6 -DMSO) δ 0.82 (3H, m), 1.85-2.21 (2H, m), 2.35-3.21 (2H, m), 4.20-5.75 (4H, m), 6.80 (1H, m), 7.68 (1H, m), 7.92 (1H, m), 8.04 (1H, m), 8.49 (1H, s), 8.56-8.95 (1H, brm) ppm; ^{19}F NMR (376MHz, d_6 -DMSO) (质子去偶的) δ -61.32, -61.38, -226.70, -226.76, -230.47, -231.06, -232.61, -232.67; MS ES (-) 429.30 (M-H).

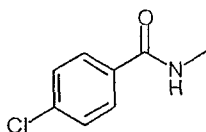
实施例 3:

(S)-3-[2-(6-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸



方法 H:

4-氯-N-甲基-苯甲酰胺

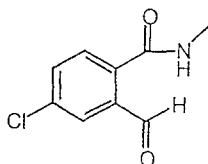


向 0℃ 的 4-氯苯甲酰氯 (4.50g) 的二氯甲烷 (10ml) 溶液中逐滴加入 8M 的甲胺乙醇溶液。该溶液搅拌 16 小时后蒸干。残余物用饱和碳酸氢钠溶液 (10ml) 稀释, 用乙酸乙酯萃取 3 次 (3x20ml), 有机层用盐水 (10ml) 洗涤, 干燥 (MgSO₄) 并真空浓缩, 得到副标题化合物, 白色固体 (4.33g, 97%)。

¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 3.00 (3H, s), 7.40 (1H, br) 7.40 (1H, d), 7.70 (1H, d) ppm.

方法 I:

2-甲酰基-4-氯-N-甲基苯甲酰胺



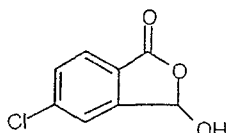
向 4-氯-N-甲基-苯甲酰胺 (3.1g) 的 THF (30ml) 溶液中加入正丁基锂 (30.1ml 的 2.5M 己烷溶液), 并将溶液回流 45 分钟。然后把溶液冷却到 0℃, 在 2 分钟内滴加 N-甲基甲酰苯胺 (9.27ml)。然后将溶液回流 2 小时, 冷却到环境温度, 加入水 (80ml) 并用 2M HCl 将溶液酸化到 pH 值=1。将溶液用乙酸乙酯萃取 3 次 (3x50ml), 用盐水 (20ml) 洗涤, 干燥 (MgSO₄) 并真空浓缩。所得棕色油在二氧化硅上通过急骤层析纯化, 得到副标题产物, 浅黄色固体 (2.13g, 59%)。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3)

δ 2.90 (3H, s), 4.25 (1H, d, J) 5.60 (1H, d, J), 7.35 (2H, s), 7.60 (1H, s) ppm.

方法 J:

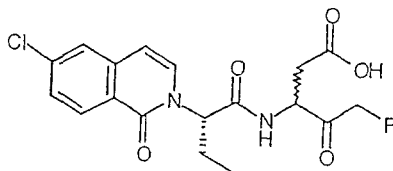
2-甲酰基-4-氯苯酸



将 2-甲酰基-4-氯-N-甲基苯甲酰胺 (3.19g) 和 10M 盐酸 (30ml) 的混合物回流加热 18 小时。将混合物冷却并用饱和碳酸氢钠溶液碱化。之后将溶液用乙酸乙酯洗涤, 然后用 2M 盐酸酸化。产物用乙酸乙酯萃取, 合并的萃取经硫酸镁干燥。然后将溶液过滤和浓缩。得到 2-甲酰基-4-氯苯酸, 黄色固体 (2.22g, 75%)。

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ 6.65 (0.5H, brs), 7.50 (2H, m), 7.65 (1H, m), 7.85 (0.5H, brm), 8.05 (1H, m) ppm.

(S)-3-[2-(6-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸

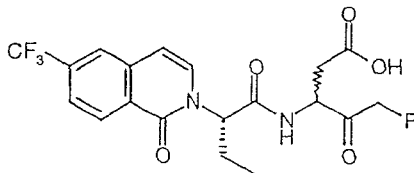


这是使用类似于方法 A-G 中所述的方法, 从 2-甲酰基-4-氯苯酸 (如方法 H-J 所述制备) 制备的。通过制备 HPLC 分离标题化合物, 得到白色固体。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ
 0.97 (3H, m), 1.90-2.31 (2H, m), 2.65-3.30 (2H, m), 4.20-
 5.75 (4H, m), 6.65 (1H, m), 7.40-7.60 (3H, m), 8.29 (1H,
 m), 9.20 (1H, br) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) (质子
 去偶的) δ -229.80, -232.07, -232.43, -232.58, -232.78;
 MS ES (-) 395.26 (M-H).

实施例 4:

(S)-3-[2-(6-三氟甲基-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸

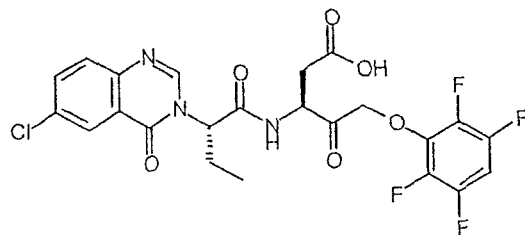


这是使用类似于 A-G 中所述的方法, 从 2-甲酰基-4-三氟甲基苯甲酸 (使用类似于 H-J 所述的方法, 从 4-三氟甲基苯甲酸制备) 制备的。分离出标题化合物, 为白色固体 (95%, 最后一步)。

^1H NMR (400
 MHz, CDCl_3) δ 0.99 (3H, m), 1.90-2.30 (2H, m), 2.60-3.50
 (2H, m), 4.20-5.75 (4H, m), 6.80 (1H, m), 7.50-7.90 (3H,
 m), 7.92 (1H, m), 8.40-8.60 (1H, m) ppm; ^{19}F NMR (376
 MHz, d_6 -DMSO) (质子去偶的) δ -63.60, -63.61, -63.65,
 -231.67, -231.80, -232.06, -232.18; MS ES(+) 431.26
 (M+H).

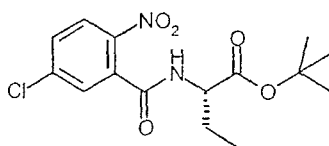
实施例 5:

(S, S)-3-[2-(6-氟-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-4-氧代-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)戊酸



方法 K:

(S)-2-(5-氯-2-硝基苯甲酰基氨基)-丁酸叔丁基酯

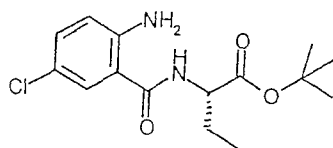


在 0℃下，向搅拌的 5-氯-2-硝基苯甲酸 (4.68g) 的无水四氢呋喃 (100ml) 溶液中加入 (S)-2-氨基丁酸叔丁基酯盐酸盐 (5g)，HOBt (3.45g)，DMAP (2.98g)，随后加入 EDC (4.88g) 和二异丙基乙胺 (3.30g)。反应混合物搅拌 10 分钟，然后升温到室温并搅拌 16 小时，之后减压浓缩。所得残余物在 EtOAc (100ml) 和饱和碳酸氢钠溶液 (100ml) 之间分配，分离出有机层，进一步用 1M 的盐酸和饱和盐水溶液洗涤，干燥 (MgSO₄)，过滤和浓缩，得到副标题化合物，浅黄色油状物 (6.82g，产率 68%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (1H, d), 7.55 (2H, m), 6.4 (1H, m) 4.7 (1H, m), 2.1 (1H, m), 1.95 (1H, m), 1.5 (9H, s), 1.0 (3H, t) ppm.

方法 L:

(S)-2-(2-氨基-5-氯-苯甲酰基氨基)-丁酸叔丁基酯



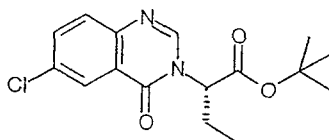
在环境温度下，向搅拌的(S)-2-(5-氯-2-硝基苯甲酰基氨基)-丁酸叔丁基酯(5.72g)的乙醇(250ml)溶液中加入氯化锡(II)二水合物(18.8g)。混合物在环境温度下搅拌 16 小时。体积在减压下降低到大约 50ml，然后将反应混合物用 1M NaOH 稀释，直到形成的沉淀再溶解(400ml)。然后用乙醚萃取水溶液(3x100ml)。合并有机萃取液，用盐水洗涤，干燥(MgSO₄)，并浓缩，得到副标题化合物，黄色固体(4.60g，产率 88%)。

¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ 7.4 (1H, s), 7.2 (1H, d), 6.6 (2H, m), 5.5 (2H, m), 4.6 (1H, m), 2.0 (1H, m), 1.85 (1H, m), 1.5 (9H, s), 0.95 (3H, t) ppm.

方法 M:

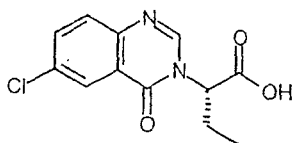
(S)-2-(6-氯-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸叔丁基酯



将 2-(2-氨基-5-氯苯甲酰基氨基)-丁酸叔丁基酯(2.82g)溶于原甲酸三甲酯(50ml)中。加入乙酸(10ml)，并将反应混合物回流 48 小时。之后，除去溶剂，残余物在乙酸乙酯和饱和碳酸氢钠溶液之间分配。水层进一步用乙酸乙酯萃取，合并的有机萃取液用盐水洗涤，干燥(MgSO₄)，并减压浓缩，得到黄色油状物。这通过急骤层析纯化(20%的 EtOAc:石油醚)，得到副标题化合物，油状物(1.23g，产率 42%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.25 (1H, s), 8.05 (1H, s), 7.7 (2H, m), 5.3 (1H, m), 2.3 (1H, m), 2.0 (1H, m), 1.5 (9H, s), 1.0 (3H, t) ppm.

2-(6-氯-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸



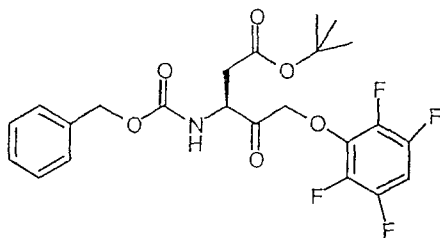
这是使用类似于方法 E 中所述的方法制备的。得到的副标题化合物为浅白色固体。

^1H NMR (400 MHz, MeOD) δ

8.3 (1H, s), 8.15 (1H, s), 7.8 (1H, d), 7.7 (1H, d), 5.2 (1H, m), 2.4 (1H, m), 2.2 (1H, m), 0.95 (3H, t) ppm.

方法 N:

(S)-3-苄氧基羰基氨基-4-氧代-5-(2,3,5,6-四氟-苯氧基)-戊酸叔丁基酯

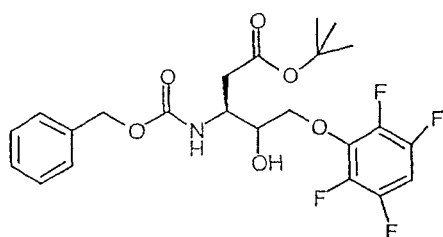


在室温和氮气气氛下,把氟化钾(2.8克)分步加入到搅拌的(S)-3-苄氧基羰基氨基-5-溴-4-氧代戊酸叔丁基酯(18.6g)和 2,3,5,6-四氟苯酚(9.3g)的无水 DMF (250mL) 溶液中。然后将混合物搅拌 18 小时,随后用乙酸乙酯和水猝灭。除去有机层,用碳酸氢钠溶液洗涤,干燥(硫酸镁)和浓缩,得到副标题产物,灰白色固体(21.1g, 96%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.43 (9H, s), 2.76 (1H, dd), 3.06 (1H, dd), 4.67-4.71 (1H, m), 5.12 (1H, d), 5.22 (1H, d), 5.86 (1H, d), 7.35-7.38 (5H, m) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3) (质子去偶的) δ -139.98, -140.00, -140.04, -140.06, -157.05, -157.07, -157.11, -157.13; MS ES (+) 486.23 (M+H).

方法 0:

(3S)-3-苄氧基羰基氨基-4-羟基-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯

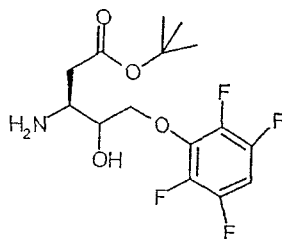


在 -20°C 和氮气保护下,将 NaBH_4 (1.65g) 分步加入到搅拌的 3-苄氧基羰基氨基-4-氧代-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯 (21.1g) 的无水 THF (220mL) 溶液中。在此温度下搅拌 3 小时后,通过加入饱和氯化铵溶液猝灭反应,并用 DCM 稀释。除去有机层,水层再用 DCM 萃取。合并的有机萃取液用盐水洗涤,干燥(硫酸镁),并浓缩。残余物通过柱层析纯化(10%-20%乙酸乙酯/己烷)。得到副标题化合物,白色固体 (14.6g, 73%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.45 (9H, s), 2.61-2.77 (2H, m), 3.16-3.36 (1H, 2 x brd d), 4.12-4.22 (2H, m), 4.30-4.33 (1H, m), 5.44-5.69 (1H, 2xd), 6.78-6.86 (1H, m), 7.35-7.36 (5H, m) ppm; ^{19}F NMR (346 MHz, CDCl_3) (质子去偶的) δ -139.87, -139.89, -139.93, -139.95, -139.98, -157.02, -157.05, -157.06, -157.08, -157.09, -157.10, -157.12; ES (+) 488.27 (M+H).

方法 P:

(3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯



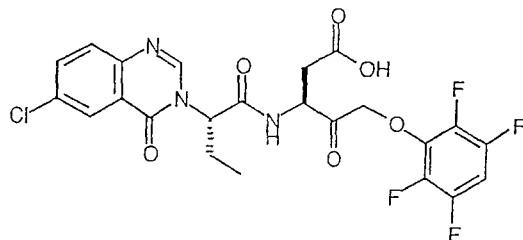
将 10% 的 Pd/碳 (2.92g) 分步加入到已经在氮气下脱气 (5 次) 的 3-苄氧基羰基氨基-4-羟基-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯 (14.6g) 的无水 MeOH (350mL) 溶液中。反应在氮气和氢气下进一步脱气 (3 次和 5 次), 并在室温下搅拌 20 分钟。过滤除去钯催化剂, 滤液浓缩得到副标题化合物, 白色固体 (9.5g, 90%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ

1.49 (9H, s), 2.35-2.43 (1H, m), 5.67-5.64 (1H, m), 3.37-3.43 (1H, m), 3.77-3.87 (1H, m), 4.28-4.63 (2H, m), 6.77-6.86 (1H, m) ppm; ^{19}F NMR (346 MHz, CDCl_3) (质子去偶的)

δ -139.95, -139.97, -140.00, -140.03, -140.05, -140.08, -140.11, -140.13, -157.15, -157.18, -157.21, -157.23, -157.27, -157.29.

(S,S)-3-[2-(6-氯-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-4-氧代-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)戊酸



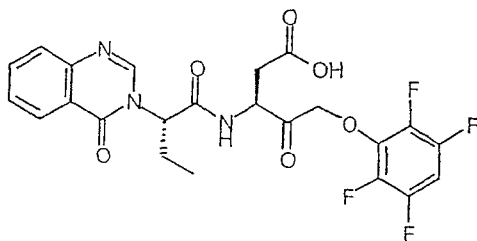
该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中所述的方法制备的。得到

的标题化合物为白色固体(TFA 盐)(94%, 最后一步)。

IR (固体) 3298.7, 1741.4, 1691.4, 1660.3, 1601.1, 1517.4, 1490.8, 1320.6, 1244.7, 1174.5, 1104.4, 939.2, 836.5, 715.5, 666.8 and 656.0 cm^{-1} ;
 ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.05 (1H, m), 8.4 (1H, s), 8.05-7.5 (4H, m), 5.45-5.15 (3H, m), 4.6 (1H, m), 2.25-2.0 (2H, m) and 0.9-0.75 (3H, m) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) (质子去偶的) δ -140.57, -140.59, -140.63, -140.65, -141.02, -141.04, -141.08, -141.10, -156.75, -156.77, -156.81, -156.83, -156.94, -156.96, -157.00, -157.02; MS ES (+) 544.2 (M+H).

实施例 6:

(S,S)-4-氧代-3-[2-(4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)戊酸

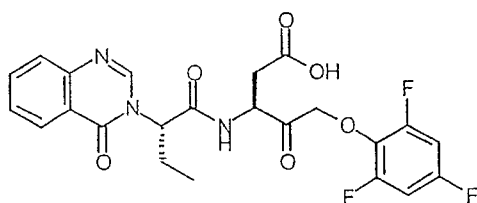


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中所述的方法, 用 2-(4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸(使用类似于方法-K-M 和 E 中描述的方法从 2-硝基苯甲酸合成)和 (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯(如方法 N-P 所述制备)制备的。得到的标题化合物为白色固体(TFA 盐)(85%, 最后一步)。

IR (固体) 1792.8, 1726.3, 1669.9, 1521.4, 1485.6, 1183.5, 1142.5, 1091.3 and 932.5 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 9.0-8.65 (1H, m), 8.35 (1H, s), 8.1 (1H, m), 7.8 (1H, m), 7.65 (1H, m), 7.55 (2H, m), 5.4-4.3 (4H, m), 2.8-2.5 (2H, m), 2.2-2.0 (2H, m) and 0.9-0.7 (3H, m) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (质子去偶的) δ -140.57, -140.60, -140.63, -140.66, -141.03, -141.05, -141.09, -141.11, -156.77, -156.80, -156.83, -156.86, -156.94, -156.97, -157.00, -157.03; MS ES(+) 510.26 (M+H).

实施例 7:

(S, S)-4-氧代-3-[2-(4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-5-(2, 4, 6-三氟苯氧基)戊酸



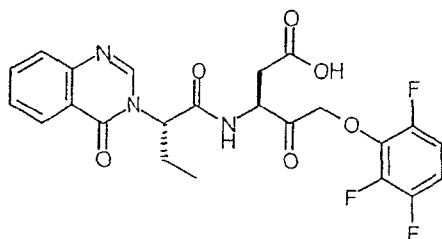
该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中所述的方法，用 2-(4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸(使用类似于方法 K-M 和 E 中描述的方法从 2-硝基苯甲酸合成)和 (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2, 4, 6-三氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯(如方法 N-P 所述从 2, 4, 6-三氟苯酚制备)制备的。得到的标题化合物为白色固体(TFA 盐)(71%，最后一步)。

IR (固体) 3308.9, 3075.4, 2928.4, 1803.1, 1726.9, 1672.7, 1612.1, 1510.0, 1478.7, 1452.8, 1407.6, 1231.3, 1199.3, 1121.0, 1040.4, 997.6, 933.1, 839.7, 772.9, 720.3 和 698.4 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.84-0.86 (3H, m), 2.04-2.95 (4H,), 4.05-5.48 (5H, 6), 7.13-7.21 (2H, m), 7.54-7.57 (1H, m),

7.69-7.72 (1H, m), 7.84-7.88 (1H, m), 8.07-8.13 (1H, m),
8.38 (1H, s), 8.60-8.97 (1H, 2xddd) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz,
DMSO- d_6) (质子去偶的) δ -115.4, -115.6, -124.9, -
125.0, -125.6; MS ES (+): 492.3 (M+H).

实施例 8:

(S, S)-4-氧代-3-[2-(4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-5-(2, 5, 6-三氟苯氧基)戊酸

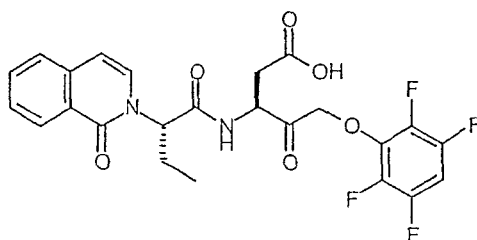


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中所述的方法，用 2-(4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸(使用类似于方法-K-M 和 E 中描述的方法从 2-硝基苯甲酸合成)和 (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2, 3, 6-三氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯(如方法 N-P 所述从 2, 3, 6-三氟苯酚制备)制备的。得到的标题化合物为白色固体(TFA 盐)(87%，最后一步)。

IR (固体) 3308.9,
3075.4, 2928.4, 1803.1, 1726.9, 1672.7, 1612.1, 1510.0,
1478.7, 1452.8, 1407.6, 1231.3, 1199.3, 1121.0, 1040.4,
997.6, 933.1, 839.7, 772.9, 720.3 和 698.4 cm^{-1} ; ^1H NMR
(400MHz, DMSO- d_6) δ 0.84-0.86 (3H, m), 2.04-2.95 (4H, 3
m), 4.05-5.48 (5H, 6 x m), 7.13-7.21 (2H, m), 7.54-7.57
(1H, m), 7.69-7.72 (1H, m), 7.84-7.88 (1H, m), 8.07-8.13
(1H, m), 8.38 (1H, s), 8.60-8.97 (1H, 2) ppm; ^{19}F NMR
(376MHz, DMSO) (质子去偶的) δ -115.4, -115.6, -
124.9, -125.0, -125.6; MS ES (+):492.3 (M+H).

实施例 9:

(S, S)-3-[2-(1-氧代-1H-喹唑啉-2-基)-丁酰氨基]-4-氧代-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)戊酸

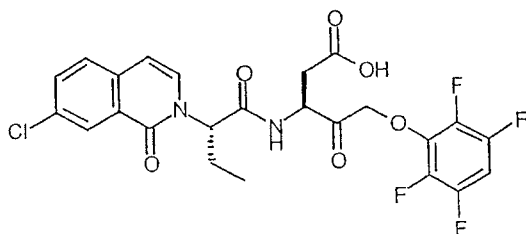


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法，用 (S)-2-(1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸(使用类似于方法 A-E 所述的方法从 2-乙酰基苯甲酸制备)和 (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯(如方法 N-P 所述制备)制备的。标题化合物通过制备 HPLC 分离。

IR (固体) 2960.2, 1780.1, 1746.2, 1646.6, 1619.0, 1589.1, 1517.4, 1490.3, 1427.8, 1260.3, 1206.2, 1176.3, 1098.9, 938.4, 788.1, 748.3, 714.2, 692.5, 665.3 和 655.8 cm^{-1} ; ^1H NMR (400MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.78-0.83 (3H, m), 1.89-1.96 (1H, m), 2.08-2.13 (1H, m), 2.50-2.78 (2H, m), 4.35-5.45 (4H, 3xm), 6.64-6.69 (1H, m), 7.74-7.73 (5H, m), 8.18-8.20 (1H, m), 8.81 & 8.90 (1H, d) ppm; ^{19}F NMR (376MHz, DMSO) (质子去偶的) δ -141.01, -141.03, -141.07, -141.09, -156.80, -156.82, -156.86, -156.88; MS ES (+) 509.2 (M+H).

实施例 10:

(S, S)-3-[2-(7-氯-1-氧代-1H-喹唑啉-2-基)-丁酰氨基]-4-氧代-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)戊酸

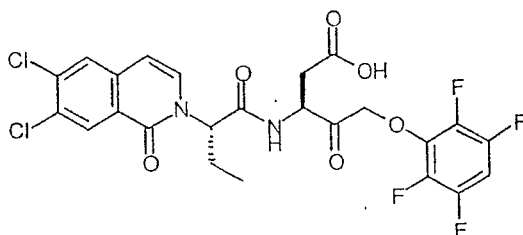


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法, 用 (S)-2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸(如方法 A-E 所述制备)和 (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯(如方法 N-P 所述制备)制备的。分离出的产物为白色固体(94%, 最后一步)。

IR (固体) 1639.3, 1618.8, 1593.2, 1516.4, 1485.6, 1219.4, 1168.1, 1106.7, 932.6, 830.2 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.80 (3H, t), 1.94-2.12 (2H, m), 2.55-2.61 (1H, m), 2.74-2.80 (1H, m), 4.58-4.63 (1H, m), 5.12-5.76 (3H, m), 6.70 (1H, d), 7.51-7.78 (4H, m), 8.11-8.12 (1H, m), 8.60-8.95 (1H, 2xd) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, d_6 -DMSO) δ 23.8, 24.5, 32.9, 34.6, 47.8, 52.8, 55.2, 58.2, 58.9, 74.4, 75.6, 100.1, 100.3, 100.5, 101.0, 101.2, 104.6, 126.5, 136.6, 131.3, 131.4, 133.0, 135.6, 135.6, 139.0, 139.1, 141.4, 141.6; 144.6, 144.8, 144.9, 147.1, 147.1, 160.7, 170.4, 172.0, 173.0, 202.2; ^{19}F NMR (376 MHz, d_6 -DMSO) (质子去偶的) δ -140.57, -140.60, -140.64, -140.66, -141.00, -141.03, -141.06, -141.09, -156.78, -156.80, -156.84, -156.86, -156.96, -156.98, -157.02, -157.04; MS ES(+) 543.20 (M+H).

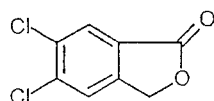
实施例 11: (S, S)-3-[2-(6, 7-二氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]

基]-4-氧代-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)戊酸



方法 Q:

5,6-二氯-3H-异苯并呋喃-1-酮



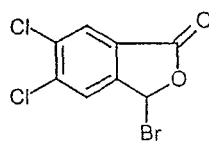
在 0℃和氮气保护下，在 1 小时内，将 NaBH₄ (5.2g) 一点点加入到搅拌的 4,5-二氯邻苯二甲酸酐 (20g) 的无水 DMF (100ml) 溶液中。反应升温到室温，进一步反应 2 小时，然后倾入到冰/1M 的 HCl 中。生成的白色沉淀 (4,5-二氯-2-羟甲基苯甲酸) 通过过滤收集，并真空干燥。将沉淀悬浮在含有催化量对甲苯磺酸的甲苯 (200mL) 中，并在 Dean-Stark 条件下 (沉淀在加热时溶解) 回流加热 18 小时。将反应冷却到室温，通过过滤收集生成的白色沉淀，得到副标题化合物，白色固体 (14.0g, 75%)。

¹H NMR

(400 MHz, d₆-DMSO) δ 5.40 (2H, s), 8.05 (1H, s), 8.15 (1H, s) ppm.

方法 R:

3-溴-5,6-二氯-3H-异苯并呋喃-1-酮

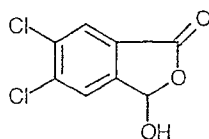


将 5,6-二氯-3H-异苯并呋喃-1-酮 (1.45g), N-溴代丁二酰胺 (1.27g) 和催化量的过氧化苯甲酰的氯仿 (30mL) 悬浮液回流加热 1 小时。冷却后, 反应混合物用水、盐水洗涤, 干燥(硫酸镁), 过滤和浓缩, 得到副标题化合物, 白色固体 (1.82g, 91%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ
7.36 (1H, s), 7.77 (1H, s), 8.03 (1H, s) ppm.

方法 S:

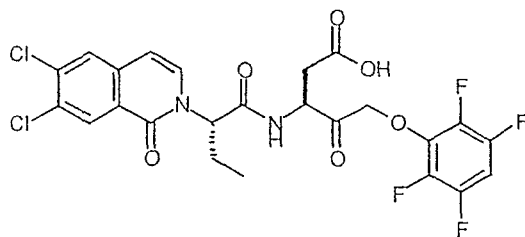
4,5-二氯-2-甲酰基苯甲酸



将 3-溴-5,6-二氯-3H-异苯并呋喃-1-酮 (2.0g) 在 5% 的 HCl 水溶液 (10mL) 和 80% 的二氧六环水溶液 (25mL) 中形成的悬浮液回流加热 2 小时。除去溶剂, 所得残余物再溶于乙酸乙酯中, 干燥(硫酸镁)和浓缩。生成的黄色固体用 DCM/己烷重结晶, 得到副标题化合物, 白色固体 (1.13g, 73%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.66 (0.84H, s), 7.95 (0.16H, s), 8.05 (0.84H),
8.12 (0.16H, s), 8.14 (0.84H, s), 8.41 (0.84H, s), 10.41
(0.16H, s), 11.07 (0.16 H, brd s) ppm.

(S,S)-3-[2-(6,7-二氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-4-氧代-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)戊酸

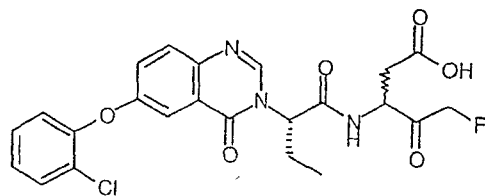


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法，用 (S)-2-(6,7-二氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸(使用类似于方法 A-E 中描述的方法，从 4,5-二氯-2-甲酰基苯甲酸合成[如方法 Q-S 所述制备])和 (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2,3,5,6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯(如方法 N-P 所述制备)制备的。分离出的标题化合物为白色固体(94%，最后一步)。

IR (固体) 1784.5, 1734.7, 1650.1, 1610.2, 1585.4, 1515.7, 1490.8, 1426.0, 1216.9, 1172.1, 1092.5, 933.1 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 0.80 (3H, t), 1.90-1.98 (1H, m), 2.04-2.12 (1H, m), 2.55-2.79 (2H, m), 4.56-4.71 (1H, m), 5.08-5.41 (3H, m), 6.67 (1H, d), 7.56-7.59 (2H, m), 8.07 (1H, brd s), 8.25 (1H, d), 8.85-8.95 (1H, 2 x d), 12.73 (1H, brd s) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, d_6 -DMSO) (质子去偶的) δ -140.93, -140.95, -140.99, -141.01, -141.04, -141.07, -141.10, -156.76, -156.79, -156.82, -156.85, -156.89, -156.91; MS ES (+): 577.14 (M+H).

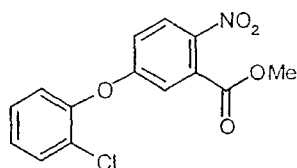
实施例 12:

3-[(2S)-2-[6-(2-氯苯氧基)-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基]-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸



方法 T:

2-硝基-5-(2-氯苯氧基)苯甲酸甲酯

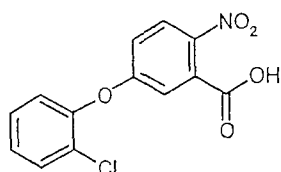


向搅拌的 5-氯-2-硝基苯甲酸甲酯 (1g, 4.6mmol) 的二甲基甲酰胺 (15ml) 溶液中加入碳酸钾 (0.96g) 和 2-氯酚 (0.66g)。反应混合物在 90 °C 下搅拌 16 小时。之后, 将反应混合物倾入到乙酸乙酯 (50ml) 中并用水 (50ml)、盐水 (50ml) 洗涤, 干燥 (MgSO₄), 和蒸发。残余物通过急骤层析纯化 (1:9 的乙酸乙酯:石油醚), 得到副标题化合物, 黄色油状物 (1.22g, 产率 85%)。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.05 (1H, m), 7.6-7.0 (6H, m), 3.95 (3H, s) ppm.

方法 U:

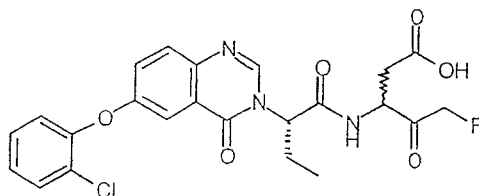
2-硝基-5-(2-氯苯氧基)苯甲酸



向搅拌的 2-硝基-5-(2-氯苯氧基)苯甲酸甲酯(1.22g)的 THF (8ml) 溶液中加入在水(2ml)中的氢氧化锂(0.333g)。反应混合物在环境温度下搅拌 16 小时。之后,将反应混合物用 1M HCl 水溶液酸化。水层用乙酸乙酯萃取(2x50ml)。合并有机层,用饱和盐水溶液洗涤,并干燥(MgSO₄)。真空除去溶剂,得到副标题化合物,米色固体(0.63g, 产率 54%)。

¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 8.05-7.0 (7H, m) ppm.

3-[(2S)-2-[6-(2-氯苯氧基)-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基]-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸



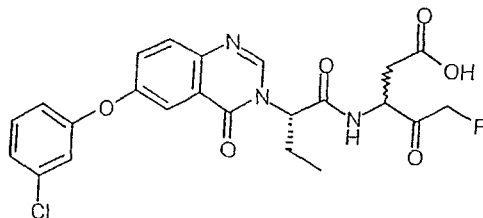
该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法,从 2-(6-[2-氯苯氧基]-4-氧代-4H-异喹啉-3-基)-丁酸(如方法 T-U, K-M 和 E 所述,从 5-氯-2-硝基苯甲酸甲酯和 2-氯酚合成)制备的。得到的标题化合物为白色固体(82%, 最后一步)。

IR (固体)

1783.38, 1721.55, 1664.48, 1550.32, 1498.00, 1474.22, 1264.94, 1193.60, 1136.52, 1055.66 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 0.81 (3H, m), 1.95-2.26 (2H, m), 2.50-2.96 (2H, m), 4.20-4.70 (1.5H, m), 5.04-5.46 (2.5H, m), 7.26-7.39 (3H, m), 7.45 (1H, m), 7.57-7.70 (2H, m), 7.78 (1H, m), 8.35 (1H, m), 8.63-8.98 (1H, brm) ppm; ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-d₆) (质子去偶的) δ -226.73, -226.78, -230.43, -230.90, -232.64, -232.55; MS ES (+) 490.40 (M+H).

实施例 13:

3-[(2S)-2-[6-(3-氯苯氧基)-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基]-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸



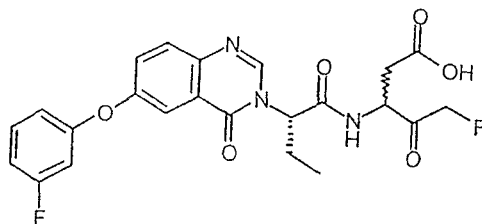
该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法，从 2-(6-[3-氯苯氧基]-4-氧代-4H-异喹啉-3-基)-丁酸(如方法 T-U, K-M 和 E 所述，从 5-氯-2-硝基苯甲酸甲酯和 3-氯酚合成)制备的。得到的标题化合物为白色固体(85%，最后一步)。

IR (固体) 1716.79, 1673.99, 1583.62, 1469.46, 1279.21, 1198.35, 1136.52 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.75-0.9 (3H, m), 1.95-2.2 (2H, m), 2.5-2.9 (2H, m), 4.2-4.7 (2H, m), 5.05-5.45 (2H, m), 7.1 (1H, m), 7.25 (1H, m), 7.3 (1H, m), 7.45 (1H, m), 7.55 (1H, m), 7.6 (1H, m), 7.8 (1H, m), 8.35 (1H, m), 和 8.65-9.0 (1H, m) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 202.6, 202.5, 173.1, 172.0, 172.0, 170.0, 169.8, 169.8, 160.2, 160.1, 158.8, 157.4, 155.3, 144.1, 134.5, 132.1, 130.1, 126.6, 124.6, 122.6, 122.5, 119.7, 118.2, 113.7, 85.3, 85.2, 83.5, 83.4, 82.9, 58.2, 57.8, 57.5, 53.0, 52.3, 52.2, 47.8, 34.6, 33.0, 24.4, 23.8 和 10.66; ^{19}F NMR (376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (p (质子去偶的) δ -226.72, -226.78, -230.90 和 -232.65; MS ES(+) 490.25 (M+H).

实施例 14:

5-氟-3-[(2S)-2-[6-(3-氟苯氧基)-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基]-丁酰氨基]

基}-4-氧代戊酸

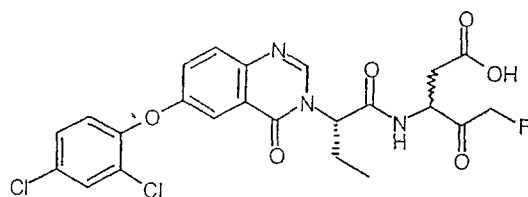


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法，从 2-[6-(3-氟苯氧基)-4-氧代-4H-异喹啉-3-基]-丁酸(如方法 T-U, K-M 和 E 所述，从 5-氯-2-硝基苯甲酸甲酯和 3-氯酚合成)制备的。得到的产物为白色固体(95%，最后一步)。

IR (固体) 1598.20, 1274.17, 1178.86, 1159.80, 1116.92 和 954.90 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.8-0.95 (3H, m), 1.95-2.2 (2H, m), 2.55-2.95 (2H, m), 4.2-4.7 (2H, m), 5.05-5.5 (2H, m), 6.95(1H, m), 7.05 (1H, m), 7.45 (1H, m), 7.55 (1H, m), 7.6 (1H, m), 7.8(1H, m), 8.4(1H, m), 和 8.65-9.0 (1H, m) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 172.0, 169.9, 169.8, 164.5, 162.1, 160.2, 155.3, 144.1, 132.0, 131.9, 130.0, 126.9, 122.6, 115.5, 113.7, 111.5, 111.3, 107.4, 107.1, 85.3, 58.2, 57.8, 52.4, 52.2, 34.6, 23.8, 和 10.7; ^{19}F NMR (376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (质子去偶的) δ -110.84, -226.73, -226.79, -230.41, -230.91, -232.64 和 -232.66; MS ES(+) 474.29 (M+H).

实施例 15:

3-((2S)-2-[6-(2, 4-二氯苯氧基)-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基]-丁酰氨基)-5-氟-4-氧代戊酸

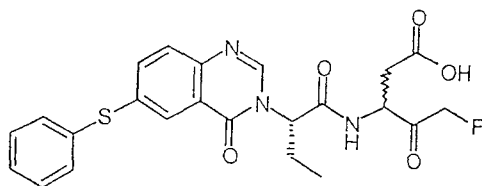


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法,从 2-[6-(2,4-二氯苯氧基)-4-氧代-4H-异喹啉-3-基]-丁酸(使用类似于方法 U, K-M 和 E 所述的方法,从 2-硝基-5-(2,4-二氯苯氧基)苯甲酸甲酯合成)制备的。得到的产物为白色固体(TFA 盐)(96%, 最后一步)。

IR (固体) 1778.63, 1716.79, 1669.23, 1493.25, 1469.46, 1264.94, 1198.35, 1150.79, 1098.47 和 1055.66 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 0.60-1.05 (3H, m), 1.94-2.26 (2H, m), 2.26-2.95 (2H, m), 4.15-4.75 (2H, m), 4.76-5.95 (2H, m), 7.25-7.45 (2H, m), 7.50 (1H, m), 7.65 (1H, m), 7.80 (1H, m), 7.87 (1H, m), 8.36 (1H, s), 8.60-9.01 (1H, brm) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) (质子去偶的) δ -226.72, -226.77, -230.41, -230.88, -232.65; MS ES (+) 524.34 (M+H).

实施例 16:

5-氟-4-氧代-3-[(2S)-2-(4-氧代-6-苯基硫烷基-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-戊酸

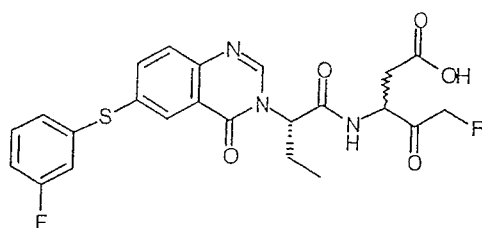


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法，从 (S)-2-(4-氧代-6-苯基硫烷基-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸 (使用类似于 T-U, K-M 和 E 中所述的方法，从 5-氯-2 硝基苯甲酸甲酯和苯硫酚合成) 制备的。得到的产物为白色固体 (TFA 盐) (81%，最后一步)。 IR

(固体) 1791.61, 1720.53, 1668.40, 1602.06, 1545.20, 1474.12, 1194.53, 1142.41 和 1057.11 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.6-8.6 (1H, m), 8.3 (1H, s), 7.85 (1H, s), 7.75-7.6 (2H, m), 7.45-7.35 (5H, m), 5.4-5.0 (2H, m), 4.6-4.15 (2H, m), 2.85-2.35 (2H, m), 2.2-1.95 (2H, m) 和 0.85-0.7 (3H, m) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ 202.6, 202.5, 173.1, 172.0, 172.0, 169.9, 169.8, 160.0, 146.5, 136.1, 135.4, 133.6, 133.3, 130.3, 128.8, 128.7, 126.7, 126.6, 122.2, 122.2, 104.0, 85.3, 85.2, 83.5, 83.4, 58.3, 57.9, 57.4, 52.3, 52.2, 47.8, 34.6, 33.0, 24.4, 23.9, 23.8 and 10.6; ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO-d_6) (质子去偶的) δ -226.72, -226.78, -230.41, -231.92, -232.65 和 -232.68; MS ES(+) 472.27 (M+H).

实施例 17:

5-氟-3 {3 (2S)-2 [6-(3-氟-苯基硫烷基)-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基]-丁酰氨基}-4-氧代戊酸



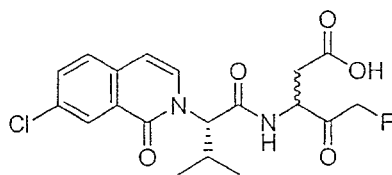
该化合物用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法，从 (S)-2 [6-(3-氟-苯基硫烷基)-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基]-丁酸 (使用类似于方法 T-U、K-M 和 E 所述的方法，从 5-氯-2-硝基苯甲酸甲酯和 3-氟苯硫酚

合成)制备的。得到的产物为白色固体(TFA盐)(95%,最后一步)。

IR (固体) 1779.2, 1722.0, 1660.1, 1602.9, 1574.3, 1474.3, 1178.8 and 1059.7 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 0.80 (3H, m), 1.92-2.25 (2H, m), 2.41-2.92 (2H, m), 4.20-4.85 (1.5H, m), 5.01-5.50 (2.5H, m), 7.12-7.27 (3H, m), 7.40-7.50 (1H, m), 7.70-7.86 (2H, m), 8.03 (1H, m), 8.43 (1H, m), 8.65-9.02 (1H, brm) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (质子去偶的) δ -111.83, -226.73, -226.79, -230.40, -230.91, -232.65, -232.67; MS ES (+) 490.35 (M+H).

实施例 18:

(S)-3-[2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-3-甲基丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸

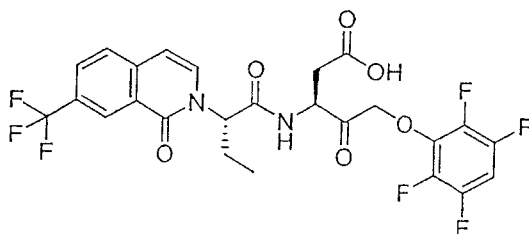


这是使用类似于方法 A-G 中所述的方法制备的(在方法 C 中使用 S-缬氨酸叔丁基酯)。产物经分离,为白色固体(91%,最后一步)。

IR (固体) 1777.5, 1644.4, 1608.5, 1588.1, 1541.9, 1198.9, 1168.1, 1045.2, 830.2 cm^{-1} ; ^1H NMR (400MHz, d_6 -DMSO) δ 0.70 (3H, m), 0.89-1.14 (3H, m), 2.31 (1H, m), 2.45-2.98 (2H, m), 4.05-4.75 (1.6H, m), 4.97-5.40 (2.4H, m), 6.70 (1H, m), 7.60-7.95 (3H, m), 8.18 (1H, m), 8.75-9.21 (1H, m) ppm; ^{19}F NMR (376MHz, d_6 -DMSO) (质子去偶的) δ -226.28, -226.71, -230.58, -230.64, -231.75, -232.32; MS ES (+) 411.36 (M+H).

实施例 19:

(S, S)-3-[2-(7-三氟甲基-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-4-氧代-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)戊酸(插入 P67 式)

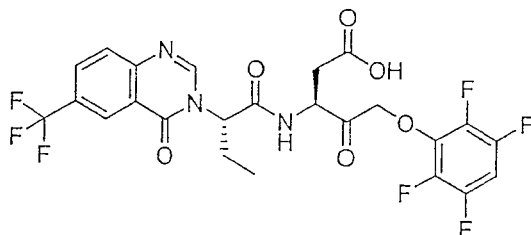


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中描述的方法, 用 (S)-2-(7-三氟甲基-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸(如方法 A-E 所述制备)和 (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯(如方法 N-P 所述制备)制备的。分离出的产物为白色固体(90%, 最后一步)。

IR (固体) 1791.6, 1649.5, 1516.8, 1493.1, 1322.5 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 0.85 (3H, t), 1.90-2.20 (2H, 2 x m), 2.50-2.90 (2H, 2 x m), 4.70 (1H, m), 5.25 (2H, dd), 5.45 (1H, m), 6.80 (1H, d), 7.65 (1H, m), 7.70 (1H, d), 7.95 (1H, d), 8.05 (1H, d), 8.45 (1H, s), 9.00 (1H, d) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, d_6 -DMSO) (质子去偶的) δ -56.60, -70.15, -136.38, -152.08.

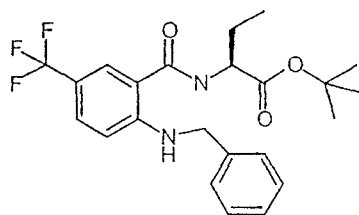
实施例 20:

(S, S)-3-[2-(7-三氟甲基-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-4-氧代-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)戊酸



方法 V:

(S)-2-(2-苄氨基-5-三氟甲基-苯甲酰基苄氨基)-丁酸叔丁基酯

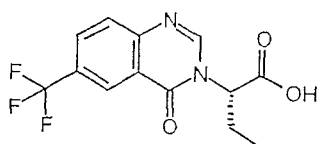


向 (S)-2-(2-氯-5-三氟甲基-苯甲酰基氨基)-丁酸叔丁基酯 (根据类似于方法 F 所述的方法, 由 2-氯-5-三氟甲基苯甲酸和 (S)-2-氨基丁酸叔丁基酯制备) (3g) 和苄胺 (1.1ml) 的 N-甲基吡咯烷 (40ml) 溶液中加入碳酸钾 (1.6g), 铜 (30mg) 和溴化铜 (I) (15mg)。混合物在 160℃ 加热 3 小时, 然后冷却到室温, 并用饱和氯化铵溶液稀释。混合物用乙酸乙酯萃取, 将有机溶液干燥 (硫酸镁), 过滤和浓缩。残余物在硅胶上通过用 15% 的乙酸乙酯/己烷洗脱而纯化。得到副标题产物, 白色固体 (950mg, 27%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3)

δ 1.04 (3H, t), 1.50 (9H, s), 2.86 (1H, m), 2.02 (1H, m), 4.50 (2H, d), 4.65 (1H, m), 6.69 (2H, m), 7.21-7.70 (7H, m), 8.42 (1H, m) ppm; MS ES(-) 435.32 (M-H).

(S)-2-(6-三氟甲基--4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸

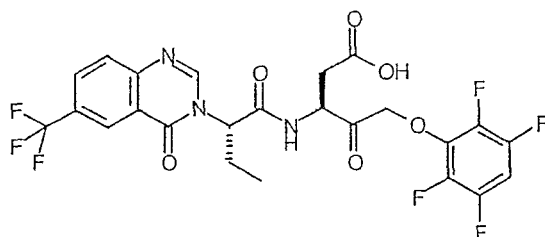


该化合物是使用类似于方法 P、M 和 E 中所述的方法, 从 (S)-2-(2-苄氨基-5-三氟甲基-苯甲酰基氨基)-丁酸叔丁基酯制备的。副标题化

合物为白色固体。

^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 0.88 (3H, t), 2.22 (2H, m), 5.15 (1H, m), 7.95 (1H, m), 8.20 (1H, m), 8.40 (1H, s), 8.60 (1H, s) ppm; MS ES (+) 301.15 (M+H).

(S, S)-3-[2-(7-三氟甲基-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-4-氧代-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)戊酸

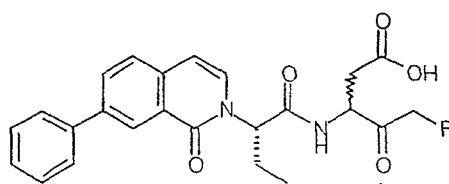


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 所述的方法，从 2-(6-三氟甲基-4-氧代-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸和 (3S)-3-氨基-4-羟基-5-(2, 3, 5, 6-四氟苯氧基)-戊酸叔丁基酯(如方法 N-P 所述制备)制备的。得到的标题化合物为白色固体(TFA 盐)(90%，最后一步)。

IR (固体) 1690, 1518, 1490, 1317, 1254, 1170, 1128 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 0.8-0.9 (3H, m), 2.05-2.2 (2H, m), 2.57-2.80 (2H, m), 4.55-4.62 (2H, m), 5.20-5.35 (3H, m), 7.50-7.62 (1H, m), 7.95 (1H, d), 8.20 (1H, d), 8.38 (1H, m), 8.52 (1H, s), 9.04 (1H, d) ppm; MS ES (+) 578.2 (M+H).

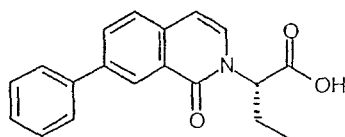
实施例 21:

(S)-3-[2-(7-苯基-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸



方法 W:

(S)-2-(7-苯基-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸

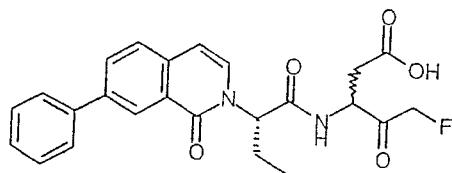


向 (S)-2-(7-氯-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸 (如方法 A-E 所述制备) (200mg) 和苯基硼酸 (276mg) 的 THF (2ml) 溶液中加入乙酸钼 (II) (1.7mg)、2-(二叔丁基膦)联苯 (4.5mg) 和氟化钾 (262mg)。所得混合物回流加热 18 小时，然后冷却并用 1M HCl (5ml) 和乙酸乙酯 (15ml) 稀释。分离有机相，水溶液用乙酸乙酯萃取 (2x15ml)。合并的有机相经干燥 (硫酸镁)，过滤和浓缩。残余物通过硅胶柱纯化，然后进一步通过用 1% 的乙酸/乙酸乙酯洗脱的径向层析纯化。得到副标题产物，棕色固体 (153mg, 66%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ

1.00 (3H, t), 2.15 (1H, m), 2.40 (1H, m), 5.37 (1H, m),
6.70 (1H, d), 7.15 (1H, d), 7.45 (1H, m), 7.55 (2H, m),
7.68 (1H, m), 7.75 (2H, m), 7.99 (1H, d), 8.70 (1H, s)
ppm.

(S)-3-[2-(7-苯基-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酰氨基]-5-氟-4-氧代戊酸

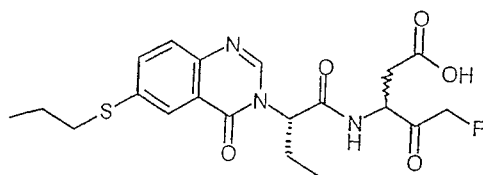


该化合物是使用类似于方法 F、G 和 E 中所述的方法，从 (S)-2-(7-苯基-1-氧代-1H-异喹啉-2-基)-丁酸制备的。得到的标题化合物为白色固体 (58%，最后一步)。

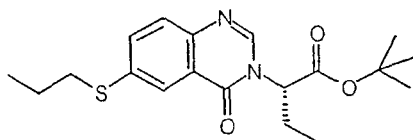
^1H NMR (400 MHz, d_6 -DMSO) δ 8.95-8.5 (1H, m), 8.45 (1H, s), 8.05 (1H, m), 7.8-7.7 (2H, m), 7.65-7.35 (4H, m), 6.7-6.65 (1H, m), 5.6-5.0 (2.4H, m), 4.7-4.2 (1.6H, m), 2.9-2.3 (H, m), 2.15-1.85 (2H, m), 0.8-0.7 (3H, m) ppm; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 202.8, 202.6, 173.2, 172.0, 170.6, 170.5, 161.7, 139.7, 138.7, 138.7, 136.1, 136.1, 131.0, 130.9, 130.8, 127.3, 125.8, 125.8, 125.7, 125.1, 105.1, 105.0, 104.8, 85.3, 85.2, 83.5, 83.4, 58.9, 58.5, 58.0, 52.3, 52.2, 47.6, 34.7, 34.6, 33.0, 32.9, 24.6, 24.1, 23.9; ^{19}F NMR (376 MHz, d_6 -DMSO) (质子去偶的) δ -226.68, -226.72, -230.50, -231.17, -232.60, -232.66; MS ES (+) 439.0 (M+H).

实施例 22:

5-氟-4-氧代-3-[(2S)-2-(4-氧代-6-丙基硫烷基-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-戊酸



(S)-2-(4-氧代-6-丙基硫烷基-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸叔丁基酯

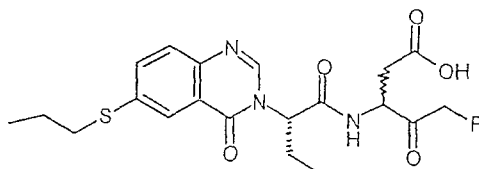


该化合物是用类似于方法 T-U 和 K-M 中所述的方法, 从 5-氯-2-硝基苯甲酸甲酯和丙硫醇制备的。副标题化合物为固体。

^1H NMR (400

MHz, CDCl_3) δ 1.00 (3H, t), 1.10 (3H, t), 1.51 (9H, s),
1.75 (2H, m), 2.01 (1H, m), 2.31 (1H, m), 3.03 (2H, m),
5.30 (1H, m), 7.60-7.70 (2H, m), 8.05 (1H, s), 8.13 (1H,
s) ppm; MS ES (+) 363.29 (M+H).

5-氟-4-氧代-3-[(2S)-2-(4-氧代-6-丙基硫烷基-4H-喹唑啉-3-基)-丁酰氨基]-戊酸



该化合物是用类似于方法 F 中所述的方法, 从 (S)-2-(4-氧代-6-丙基硫烷基-4H-喹唑啉-3-基)-丁酸(用 TFA/DCM 由叔丁基酯合成)制备的。所得的醇用四-正丙基铵过钨酸盐(VII)/N-甲基吗啉-N-氧化物(Synthesis, 639(1994))氧化, 并如方法 E 中所述脱去叔丁基酯保护基。得到的标题化合物为白色固体(90%, 最后一步)(TFA 盐)。

IR (固体) 2963.9, 1786.2, 1739.4, 1666.8, 1195.2 cm^{-1} ; ^1H

NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1.02 (3H, t), 1.08 (3H, t), 1.70-
1.80 (2H, m), 2.02-2.09 (1H, m), 2.29-2.36 (1H, m), 2.72-
2.92 (1H, m), 3.00-3.15 (1H, m), 3.03 (2H, t), 4.50-5.20

(3H, m), 5.40-5.60 (1H, m), 7.69-7.75 (2H, m), 8.06-8.07
(1H, m), 8.60-8.64 (1H, m) ppm; ^{19}F NMR (376 MHz, CDCl_3)
(质子去偶的) -76.23, -231.5; MS ES(+) 436.3 (M+H).

实施例 23

酶试验

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶抑制试验是基于重组的、纯化人类天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1、-3、-7 或-8 对荧光底物的裂解。该试验基本上按照与 Garcia-Calvo 等 (J. Biol. Chem. 273, 32608-32613 (1998)) 所报道的相同的方式用对各种酶特异性的底物进行。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1 的底物是乙酰基-Tyr-Val-Ala-Asp-氨基-4-甲基香豆素。天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3、-7 和 8 的底物是乙酰基-Asp-Glu-Val-Asp-氨基-4-甲基香豆素, 两者均在 Garcia-Calvo 等的文章 (J. Biol. Chem. 273, 32608-32613 (1998)) 中有公开。

通过将数据直接带入 Thornberry 等所描述的方程式 (Biochemistry 33, 3943-3939 (1994)) 用非线性最小二乘法分析计算机程序 (PRISM 2.0; GraphPad 软件) 计算出在特定抑制剂浓度下观测到的酶失活速率 K_{obs} 。为了获得二级速率常数 K_{inact} , 将 K_{obs} 值对各自的抑制剂浓度绘图然后通过线性回归计算出 K_{inact} 。

表 2 显示了通过上述方法测定的选定的本发明化合物对天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-1、-3、和-8 活性的抑制作用。 $K_{\text{inact}} (\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}) > 500000$ 的化合物列为“A”, $K_{\text{inact}} (\text{M}^{-1}\text{S}^{-1})$ 在 100000-500000 之间的化合物列为“B”, $K_{\text{inact}} (\text{M}^{-1}\text{S}^{-1}) < 100000$ 的化合物列为“C”。

表 2. 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) -1、-3 和-8 的抑制

化合物编号	k _{inact}		
	Caspase-1	Caspase-3	Caspase-8
1	A	A	B
2	A	A	A
3	B	B	C
4	B	B	C
5	A	A	B
6	B	A	C
7	C	B	C
8	B	B	C
9	B	B	C
10	A	A	C
11	A	A	C
12	A	A	A
13	B	B	A
14	A	A	B
15	B	B	A
16	A	A	A
17	A	A	A
18	B	B	C
19	A	A	C
20	A	A	C
21	A	A	A
22	A	A	A

实施例 24

抑制全血分泌 IL-1 β

新近从健康的供体采集全血并在 PBS 中稀释到 1:2。向 500 μ l 稀释的血液中加入 50ml 预先在 RPMI 介质中稀释的试验化合物和 10ml LPS (在平底板上的最终浓度为 50ng/ml) (LPS, Serotype 0111:B4, Sigma L3012)。刺激 18 小时后, 收集上清液并用适当的 ELISA 试剂盒 (R&D 体系) 测定其 IL-1 β 水平。

下表 3 显示了通过上述方法测定的选定的本发明化合物对人类全血分泌 IL-1 β 的抑制。IC₅₀>10 μ M 的化合物列为“A”, IC₅₀在 1 μ M-10 μ M 之间的化合物列为“B”, IC₅₀<1 μ M 的化合物列为“C”。

表 3. 对分泌 IL-1 β 的抑制作用

化合物编号	IC ₅₀ (μ m)
1	C
2	C
3	B
4	B
5	B
6	B
7	A
8	B

化合物编号	IC ₅₀ (μm)
9	A
10	B
11	A
12	B
13	B
14	C
15	B
16	B
17	B
18	B
19	B
20	A
21	B
22	C

实施例 25

缺氧引起的大鼠皮层神经元的细胞凋亡

通过 Rogers 等人在 Brain Res. Bulletin, 44:131(1998)中所述方法的改良法, 将皮层神经元从威斯塔大鼠胚胎(E17)分离开来。简要说, 无菌地从 15-20 个威斯塔大鼠胚胎中分离出大脑皮质。通过将所述大脑皮质切碎并用木瓜蛋白酶将其消化而制备细胞悬液。将细胞用卵类粘蛋白酶抑制剂和 DNaseI 洗涤, 并沉积到 Poly-D 赖氨酸涂渍的平底盘上, 该平底盘处于含有 10%的加热灭活的胎牛血清, L-谷氨酸盐, 青霉素和链霉素的高葡萄糖 DMEM 中。神经元的收率是每个胚胎

10x7 个，它们中有 80-90%适宜用于通过锥虫蓝排除法进行评价。

在缺氧实验之前，将神经元在完全培养基中培养 48 小时，温度为 37℃，标准大气压。在缺氧实验时，用贫氧无血清培养液替代正常的细胞介质。将细胞在 95%N₂/5%CO₂ 的环境中培养不同的持续时间。将化合物溶于二甲亚砜中，使其浓度为 100mM，然后在介质中稀释，并在时间=0 时加入到培养液中。使用检测 DNA 断裂的细胞死亡检测 ELISA 试剂盒 (Roche) 测定细胞凋亡的水平。对平底盘在 405nm 处读数。对照物包括在好气条件下在含血浆的介质 (+血浆) 中培养的细胞和在好气条件下在不含血浆的介质 (-血浆) 中培养的细胞。

表 4 显示了选定的本发明的化合物在缺氧引起的大鼠皮层神经元细胞凋亡中的活性结果。IC₅₀>0.5μM 的化合物列为 "A"。IC₅₀ 在 0.1μM-0.5μM 之间的化合物列为 "B"。IC₅₀<0.1μM 的化合物列为 "C"。

表 4. 缺氧引起的细胞凋亡试验的活性

化合物编号	IC ₅₀ (μm)
1	B
2	A
3	B
4	A
5	B
6	B
7	A
8	B
9	B
10	C
11	B

化合物编号	IC ₅₀ (μm)
12	A
13	B
14	A
15	B
16	B
17	B
18	B
19	C
20	B
21	B
22	A

尽管已经描述了本发明的一些实施方案，显然，改变这些基本实施例可以得到利用本发明的化合物和方法的其它上述方案。因此，应当认识到本发明的范围是由权利要求限定，而不是由已经通过实施例代表的特定实施方案限定。