

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A01N 1/02

A61K 38/05 C07K 5/06

C12N 1/04 C12N 5/02



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98810022.3

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 18 日

[11] 授权公告号 CN 1138472C

[22] 申请日 1998.10.9 [21] 申请号 98810022.3

[30] 优先权

[32] 1997.10.10 [33] US [31] 60/061,676

[86] 国际申请 PCT/US98/21232 1998.10.9

[87] 国际公布 WO99/18781 英 1999.4.22

[85] 进入国家阶段日期 2000.4.10

[71] 专利权人 西托维亚公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·F·W·克阿纳 蔡遂雄

J·古阿斯特拉 杨 武

J·A·德里威

审查员 王莉敏

[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

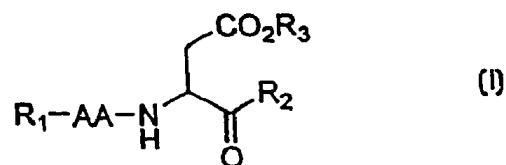
代理人 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 35 页 附图 11 页

[54] 发明名称 二肽型编程性细胞死亡抑制剂及其
用途

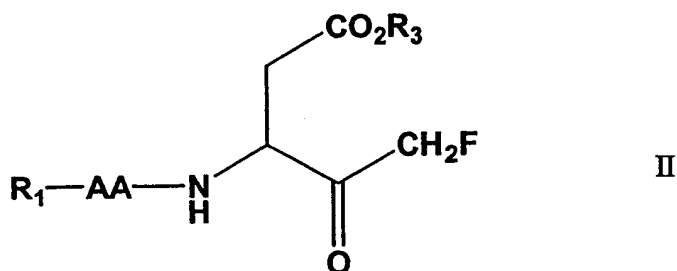
[57] 摘要

本发明涉及通式(I)代表的新的二肽,其中 R₁-R₃和 AA 如本文中所定义。本发明涉及一项发现,即:式(I)化合物是编程性细胞死亡的强抑制剂。因此,本发明的抑制剂可以在细胞、组织或整个器官发生损失的各种临床疾病中延缓或阻断细胞死亡。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、式 II 的二肽:



其中:

R_1 是 N-末端保护基, 选自叔丁氧羰基 (Boc)、乙酰基 (Ac) 和苄氧羰基 (Cbz); R_3 是 C_{1-6} 烷基或 H; AA 是选自 Val、Ile 和 Leu 的氨基酸残基。

- 2、如权利要求 1 所述的二肽, 其中 R_3 是甲基或氢。
- 3、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Cbz-Val-Asp-CH₂F。
- 4、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Cbz-Leu-Asp-CH₂F。
- 5、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Cbz-Ile-Asp-CH₂F。
- 6、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Ac-Val-Asp-CH₂F。
- 7、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Ac-Leu-Asp-CH₂F。
- 8、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Ac-Ile-Asp-CH₂F。
- 9、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Boc-Val-Asp-CH₂F。
- 10、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Boc-Leu-Asp-CH₂F。
- 11、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Boc-Ile-Asp-CH₂F。
- 12、如权利要求 2 所述的二肽, 它是 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F。
- 13、如权利要求 12 所述的二肽, 它是 Cbz-Leu-Asp(OMe)-CH₂F。
- 14、如权利要求 12 所述的二肽, 它是 Cbz-Ile-Asp(OMe)-CH₂F。
- 15、一种药物组合物, 它包含权利要求 1 的二肽和药学上可接受的载体。
- 16、一种抑制细胞或组织内细胞死亡的方法, 它包含使所述细胞或组织在体外与有效量的权利要求 1 所述化合物接触。

17、权利要求 1 所述化合物在制备可用于治疗或改善动物的中枢和周围神经系统、视网膜神经元、心肌或免疫系统细胞中的细胞死亡的药物中的用途。

18、如权利要求 17 所述的用途，其中所述细胞死亡是在中枢或周围神经系统中，并且是由于下列原因之一引起的：

(a) 选自因中风导致的病灶局部缺血和因心搏停止导致的普遍缺血的缺血和兴奋毒性疾病；

(b) 创伤性损伤；

(c) 病毒感染；

(d) 辐射诱导的神经细胞死亡；或

(e) 选自早老性痴呆、帕金森氏症、朊病毒疾病、多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化和脊髓延髓萎缩的神经变性疾病。

19、如权利要求 17 所述的用途，其中所述细胞死亡是在中枢或周围神经系统中，并且是由于特异基因的三核苷酸重复区的扩展引起的。

20、如权利要求 17 所述的用途，其中所述细胞死亡是由于杭廷顿氏舞蹈病引起的。

21、如权利要求 17 所述的用途，其中所述细胞死亡是在心肌组织中，并且是由于心肌梗塞、充血性心力衰竭、心肌病或心脏的病毒感染引起的。

22、如权利要求 17 所述的用途，其中所述细胞死亡是在视网膜神经元中，并且是由于眼内压升高、年龄相关性黄斑变性或色素性视网膜炎引起的。

23、如权利要求 17 所述的用途，其中所述细胞死亡是在免疫系统中，并且是由于选自获得性免疫缺陷综合征、重症联合免疫缺陷综合征和辐射诱导的免疫抑制的免疫缺陷疾病引起的。

24、如权利要求 17 所述的用途，其中所述细胞死亡是由于选自红斑狼疮、类风湿性关节炎和 I 型糖尿病的自身免疫疾病引起的。

25、如权利要求 17 所述的用途，其中所述细胞死亡是由于 I 型糖尿病引起的。

26、权利要求 1 所述化合物在制备可用于治疗或预防动物的多囊肾病或贫血/红细胞生成的药物中的用途。

27、一种保护哺乳动物的器官或组织免受因正常血液供给丧失而导致的细胞死亡的方法，该方法包含在体外将所述器官或组织与有效量的权利要求 1 化合物接触。

28、如权利要求 27 所述的方法，其中所述器官或组织在移植到哺乳动物体内之前存在于储存介质中。

29、如权利要求 27 所述的方法，其中所述接触包括将所述化合物注入到器官或组织中，或者将所述器官或组织浸浴在含有所述化合物的储存介质中。

30、权利要求 1 所述化合物在制备可用于减少或预防供体器官或组织在移植到宿主中后因宿主免疫细胞的作用而导致的细胞死亡的药物中的用途。

31、一种减少或预防体外授精过程中所用的哺乳动物精子或卵细胞死亡的方法，包含在体外将所述精子或卵细胞与有效量的权利要求 1 化合物接触。

32、一种延长哺乳动物或酵母细胞系的有效期限的方法，包含将所述细胞系与权利要求 1 化合物接触。

33、如权利要求 32 所述的方法，其中所述接触包括在细胞培养基中含有所述化合物。

34、权利要求 1 所述化合物在制备可用于治疗或改善哺乳动物毛发损失或毛发过早斑白的药物中的用途。

35、如权利要求 34 所述的用途，其中治疗的是毛发损失，且所述毛发损失是由于男性模式秃发、辐射、化疗或情绪压力引起的。

36、权利要求 1 所述化合物在制备可用于局部治疗或改善哺乳动物因接触高水平辐射、热或化学物质而引起的皮肤损伤的药物中的用途。

37、如权利要求 36 所述的用途，其中所述化合物作为油膏的一部分应用。

38、如权利要求 36 所述的用途，其中所述皮肤损伤是由于严重阳光照射过度引起的，并且其中所述治疗减少了皮肤起疱和脱皮。

二肽型编程性细胞死亡抑制剂及其用途

发明背景

发明领域

本发明为医药化学领域。具体地说，本发明涉及为编程性细胞死亡的强抑制剂的二肽。本发明还涉及这些二肽在降低或治疗编程性细胞死亡中的应用。

背景技术的描述

有机体通过不同地称作受控细胞死亡、程序细胞死亡或编程性细胞死亡的过程清除不需要的细胞。这种细胞死亡是动物发育以及组织内环境稳定和老化的正常状况 (Glucksmann, A., *剑桥哲学协会的生物学评论 (Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc.)* 26: 59-86 (1951); Glucksmann, A., *生物学文献* 76: 419-437 (1965); Ellis 等, *发育 (Dev.)* 112: 591-603 (1991); Vaux 等, *细胞* 76: 777-779 (1994))。编程性细胞死亡调节细胞数目, 促进形态形成, 去除有害或异常细胞并清除那些已完成其功能的细胞。另外, 编程性细胞死亡会响应各种生理压力、诸如氧不足或局部缺血而发生 (PCT 公布的申请 W096/20721)。

经历受控细胞死亡的细胞有许多共有的形态学变化, 包括胞浆和核膜起泡, 细胞皱缩 (核质和胞质浓缩), 细胞器重新定位和压缩, 染色质浓缩以及产生凋亡细胞体 (含胞内物质的膜封闭颗粒) (Orrenius, S., *国际医学杂志* 237: 529-536 (1995))。

编程性细胞死亡是通过细胞自杀的内源性机理实现的 (Wyllie, A. H., *生物学和病理学中的细胞死亡*, Bowen 和 Lockshin 编, Chapman 和 Hall 出版 (1981), 9-34 页)。因内部或外部信号的作用, 细胞激活其内部编码的自杀程序。该自杀程序是通过精细调控的基因程序的活化而完成的 (Wyllie 等, *Int. Rev. Cyt.* 68:

251(1980); Ellis 等, *细胞生物学年评* 7: 663(1991))。凋亡细胞和细胞体通常在裂解前被邻近细胞或巨噬细胞识别并清除。由于这种清除机理, 尽管有大量的细胞被清除, 但并不会诱导炎症 (Orrenius, S., *国际医学杂志* 237: 529-536(1995))。

哺乳动物白介素-1 β (IL-1 β) 在各种病理学过程中起着重要的作用, 所述病理学过程包括慢性和急性炎症以及自身免疫疾病 (Oppenheim, J. H. 等, *今日免疫学* 7: 45-56(1986))。IL-1 β 是作为细胞相关前体多肽 (IL-1 β 原) 合成的, 该 IL-1 β 原不能结合 IL-1 受体, 并且无生物学活性 (Mosley 等, *生物化学杂志* 262: 2941-2944(1987))。通过抑制 IL-1 β 前体向成熟 IL-1 β 的转化, 就可以抑制白介素-1 的活性。白介素-1 β 转化酶 (ICE) 是对白介素-1 β (IL-1 β) 的活化起作用的蛋白酶 (Thornberry, N. A., 等, *自然* 356: 768(1992); Yuan, J. 等, *细胞* 75: 641(1993))。ICE 是一种能裂解无活性白介素-1 原产生成熟 IL-1 的底物特异性半胱氨酸蛋白酶。编码 ICE 和 CPP32 的基因是哺乳动物 ICE/Ced-3 基因家族中的成员, 目前该基因家族包括至少 12 个成员: ICE, CPP32/Yama/Apopain, mICE2, ICE4, ICH1, TX/ICH-2, MCH2, MCH3, MCH4, FLICE/MACH/MCH5, ICE-LAP6 和 ICE_{rel}III。这一半胱氨酸蛋白酶家族的蛋白水解活性在细胞死亡的介导中显得很关键, 它们的活性位点半胱氨酸残基是 ICE 介导的编程性细胞死亡必需的 (Miura 等, *细胞* 75: 653-660(1993))。最近, 该基因家族已被命名为 caspases (Alnemri, E. S. 等, *细胞* 87: 171(1996))。

IL-1 也是一种参与介导广泛生物学应答的细胞因子, 所述生物应答包括炎症、败血症性休克、伤口愈合、血细胞生成和某些白血病生长 (Dinarello, C. A., *血液* 77: 1627-1652(1991); diGiovine 等, *今日免疫学* 11: 13(1990))。

现已基于 caspases 的肽底物结构制备了许多强 caspases 抑制剂。然而, 与它们的体外强效能相反, 还未报道有对编程性细胞死亡完整细胞模型具有良好功效 ($IC_{50} < 1\mu M$) 的抑制剂 (Thornberry,

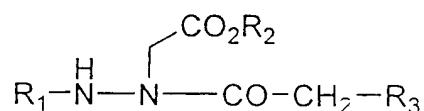
N. A., 化学生物学(*Chem. Biol.*)5: R97-103(1998))。因此, 需要能在编程性细胞死亡的完整细胞模型中显示出功效($IC_{50} < 1\mu M$)并且在编程性细胞死亡的动物模型中有效的细胞死亡抑制剂。这些抑制剂可以用作治疗剂, 用于治疗其中受控细胞死亡和 IL-1 的细胞因子活性起作用的疾病状态。

W093/05071 公开了肽 ICE 抑制剂, 其结构式为:



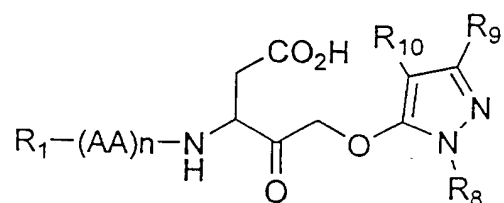
其中 Z 是 N-末端保护基; Q₂ 为 0-4 个氨基酸, 使得序列 Q₂-Asp 相当于序列 Ala-Tyr-Val-His-Asp 的至少一部分; Q₁ 包含负电性离去基。示范性的二肽是 Boc-His-Asp-CH₂F, Boc-Tyr-Asp-CH₂F, Boc-Phe-Asp-CH₂F, Ac-His-Asp-CH₂F, Ac-Tyr-Asp-CH₂F, Ac-Phe-Asp-CH₂F, Cbz-His-Asp-CH₂F, Cbz-Tyr-Asp-CH₂F 和 Cbz-Phe-Asp-CH₂F。

W096/03982 公开了作为 ICE 抑制剂的天冬氨酸类似物, 其结构式为:



其中 R_2 是 H 或烷基; R_3 是离去基诸如卤素; R_1 是杂芳基-CO 或氨基酸残基。

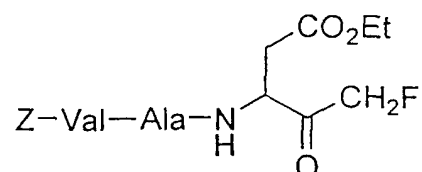
美国专利 5,585,357 公开了作为 ICE 抑制剂的肽酮，其结构式
为：



其中 n 为 0-2; AA 各自独立地为 L-缬氨酸或 L-丙氨酸; R₁ 选自 N-苄氧基羰基和其他基团; R₈、R₉、R₁₀ 各自独立地为氢、低级烷基和

其他基团。

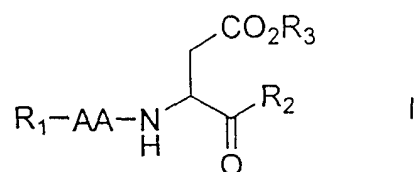
Revesz 等 (四面体快报 35: 9693-9696, 1994) 报道了作为相应酸的药物前体的乙酯三肽的制备:



所述相应酸是一种强 ICE 抑制剂。

发明概述

本发明涉及式 I 的二肽:



其中 R_1 是 N-末端保护基; AA 是任何天然 α -氨基酸的残基、或 β -氨基酸; R_2 是 H 或 CH_2R_4 , 其中 R_4 是负电性离去基; R_3 是烷基或 H, 条件是 AA 不为 His、Tyr、Pro 或 Phe。

本发明涉及一项发现, 即: 尽管式 I 代表的二肽基 caspase 抑制剂在酶试验中显示对酶的效力比三肽和四肽抑制剂低, 但却在基于细胞的系统中令人惊奇地显示为编程性细胞死亡的强抑制剂。这些化合物在小鼠肝编程性细胞死亡模型中表现出体内系统活性并且是抗 Fas 诱导致死的强抑制剂, 在缺血性中风大鼠模型中, 显示出强的神经保护作用。

本发明还涉及本发明的二肽在减轻、预防或治疗其中编程性细胞死亡是致病因素或是其结果的疾病中的应用。本发明应用的实例包括: 在病灶局部缺血和普遍缺血后保护神经系统; 治疗神经变性疾病, 诸如老年性痴呆、杭廷顿氏舞蹈病、朊病毒疾病、帕金森氏症、多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化、共济失调、毛细血管扩张和脊髓延

髓萎缩；治疗心脏病，包括心肌梗塞、充血性心力衰竭和心肌病；治疗视网膜疾病；治疗自身免疫疾病，包括红斑狼疮、类风湿性关节炎、I型糖尿病、斯耶格伦氏综合征和肾小球性肾炎；治疗多囊肾病和贫血/红细胞生成；治疗免疫系统疾病，包括AIDS和SCIDS；在移植过程中减少或预防细胞、组织和器官损伤；在工业化生物工程中减少或预防细胞系死亡；减少或预防脱发（毛发损失）；以及减少皮肤细胞的过早死亡。

本发明提供了一种药物组合物，它包含能减少动物的编程性细胞死亡的有效量的式I化合物。

本发明还提供了用于哺乳动物器官或组织的防腐或储存的溶液，或用于哺乳动物或酵母细胞的生长介质，其中在所述溶液或生长介质中包含了有效量的式I化合物，以减少所述器官、组织或细胞的编程性细胞死亡。

附图的简要描述

图1A-1G分别显示了用环己酰胺（CHX）和DMSO刺激（图1A）、用肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）/CHX和DMSO刺激（图1B）、用50 μ M BOC-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX刺激（图1C）、用50 μ M Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX刺激（图1D）、用50 μ M Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX刺激（图1E）、用50 μ M Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX刺激（图1F）、和用DMSO刺激（图1G）的Hela细胞的照片。

图2A-2G分别显示了用环己酰胺（CHX）和DMSO刺激（图2A）、用TNF- α /CHX和DMSO刺激（图2B）、用5 μ M BOC-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX刺激（图2C）、用5 μ M Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX刺激（图2D）、用5 μ M Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX刺激（图2E）、用5 μ M Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX刺激（图2F）、和用DMSO刺激（图2G）的Hela细胞的照片。

图 3A-3G 分别显示了用环己酰胺 (CHX) 和 DMSO 刺激 (图 3A)、用 TNF- α /CHX 和 DMSO 刺激 (图 3B)、用 0.5 μ M BOC-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX 刺激 (图 3C)、用 0.5 μ M Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX 刺激 (图 3D)、用 0.5 μ M Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX 刺激 (图 3E)、用 0.5 μ M Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F, TNF- α /CHX 刺激 (图 3F)、和用 DMSO 刺激 (图 3G) 的 Hela 细胞的照片。

图 4 是一个条形图, 显示了各种浓度的 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (a) 与各种浓度的 Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F (b) 相比, 保护 Hela 细胞免受 TNF- α /CHX 侵害的情况。

图 5 是一个条形图, 显示了各种浓度的 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (a) 和 BOC-Asp(OMe)-CH₂F (b) 保护 Hela 细胞免受 TNF- α /CHX 侵害的情况。

图 6 显示了各种低剂量的 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (a) 与各种低剂量的 Cbz-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F (b) 相比, 保护 Hela 细胞免受 TNF- α /CHX 侵害的情况。

图 7A-7E 显示了 Jurkat 细胞的 PARP 裂解试验结果。化合物 1 = Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F, 化合物 2 = Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F, 化合物 3 = Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F, 化合物 4 = Cbz-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-CH₂F, 化合物 5 = BOC-Asp(OMe)-CH₂F, 化合物 6 = Cbz-Asp- α -([2, 6-二氯苯甲酰氧基]甲基酮), 化合物 7 = Cbz-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F。

图 8A 和 8B 是 PARP 裂解的照片, 显示了 Z-VD-fmk 和 Z-VAD-fmk 对用抗 Fas 处理的 Jurkat 细胞的 PARP 裂解的抑制。

图 9 是存活细胞比 Z-VD-fmk 浓度图, 显示了 Z-VD-fmk 对 TNF- α 诱导的细胞死亡的抑制。

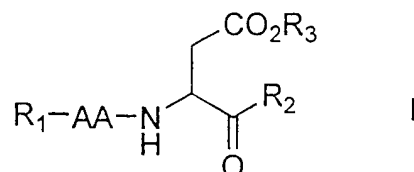
图 10 是 DNA 梯状化的照片, 显示了 Z-VD-fmk 对用抗 Fas 处理的 Jurkat 细胞的 DNA 梯状化的抑制。

图 11A 和 11B 显示了系统给药的 Cbz-Val-Asp-CH₂F 对瞬时病灶

局部缺血大鼠模型的神经保护作用。瞬间病灶局部缺血 2.25 小时和再灌注 22 小时后，定量测量皮质梗塞的体积。

发明的详细描述

本发明的编程性细胞死亡的抑制剂是通式 I 代表的化合物：



或其药学上可接受的盐或药物前体，其中：

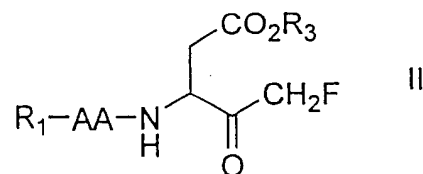
R_1 是 N-末端保护基，包括叔丁氧基羰基、乙酰基和苄氧基羰基；AA 是任何天然 α -氨基酸的残基、或 β -氨基酸，例如：Gly, Thr, Glu, Lys, Arg, Ser, Asn, Gln, Val, Ala, Leu, Ile, Met, 和 β -氨基酸诸如 β -Ala, 但它们不是 His, Tyr, Pro 或 Phe; R_2 是 H 或 CH_2R_4 , R_4 是负电性离去基诸如 F、Cl、TsO-、MeO-、ArO-、ArCOO-、ArN-和 ArS-; R_3 是烷基或 H。

关于 R_3 ，优选的烷基是 C_{1-6} 烷基，例如：甲基、乙基、丙基、异丙基、异丁基、戊基和己基。

本发明涉及一项发现，即：尽管式 I 代表的二肽基 caspase 抑制剂对酶的效力比三肽和四肽抑制剂低，但令人惊奇地是基于细胞的系统中的编程性细胞死亡的强抑制剂。这些化合物在小鼠肝编程性细胞死亡模型中表现出体内系统活性并且是抗 Fas-诱导致死的强抑制剂，在缺血性中风大鼠模型中，显示出强的神经保护作用。这些抑制剂将在与细胞、组织或整个器官发生损失有关的多种临床疾病中和工业应用中减慢或阻断细胞死亡。因此，本发明还涉及其中编程性细胞死亡起作用的疾病的治疗、预防或减少方法。这些疾病将在下文中更全面描述。

所述方法包括给予需要这种治疗的动物能抑制编程性细胞死亡的有效量的本发明抑制剂，或其药学上可接受的盐或药物前体。

可用作编程性细胞死亡抑制剂的化合物的优选实施方案是式 II 代表的化合物:



或其药学上可接受的盐或药物前体, 其中 AA、R₁ 和 R₃ 如关于式 I 的上文中所定义。

优选的 R₁ 是叔丁氧基羰基、乙酰基和苄氧基羰基。优选的 R₃ 是 H、Me、Et 或 t-Bu。优选的 AA 是 Val、Ala、Leu、Ile、Met 和 β-氨基酸诸如 β-Ala。

例举的优选的式 I 表示的编程性细胞死亡抑制剂包括但不限于:

Boc-Ala-Asp-CH₂F,
 Boc-Val-Asp-CH₂F,
 Boc-Leu-Asp-CH₂F,
 Ac-Val-Asp-CH₂F,
 Ac-Ile-Asp-CH₂F,
 Ac-Met-Asp-CH₂F,
 Cbz-Val-Asp-CH₂F,
 Cbz-β-Ala-Asp-CH₂F,
 Cbz-Leu-Asp-CH₂F,
 Cbz-Ile-Asp-CH₂F,
 Boc-Ala-Asp(OMe)-CH₂F,
 Boc-Val-Asp(OMe)-CH₂F,
 Boc-Leu-Asp(OMe)-CH₂F,
 Ac-Val-Asp(OMe)-CH₂F,
 Ac-Ile-Asp(OMe)-CH₂F,
 Ac-Met-Asp(OMe)-CH₂F,

Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F,
 Cbz-β-Ala-Asp(OMe)-CH₂F,
 Cbz-Leu-Asp(OMe)-CH₂F, 和
 Cbz-Ile-Asp(OMe)-CH₂F.

本发明的某些化合物可以作为立体异构体包括旋光异构体存在。本发明包括所有立体异构体和这些立体异构体的消旋混合物以及可以按照本领域普通技术人员熟知的方法分离的单独的对映体。

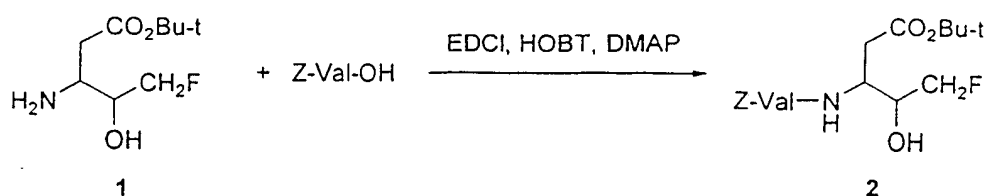
药学上可接受的加成盐的实例包括无机和有机酸加成盐, 诸如盐酸盐、氢溴化物、磷酸盐、硫酸盐、柠檬酸盐、乳酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、富马酸盐、扁桃酸盐和草酸盐。

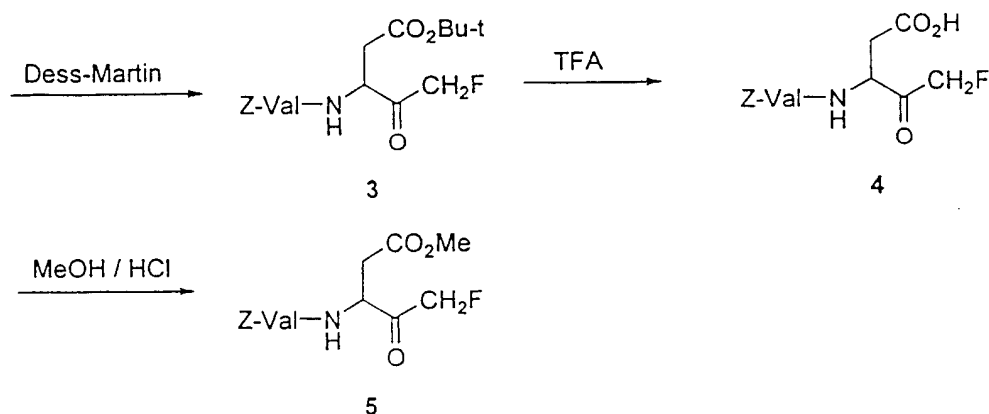
药物前体的实例包括其中 R₃ 是烷基或取代烷基 (诸如 CH₂OCH₃) 的式 I-II 化合物。另外, 当 AA 含有羧基团时, 其中 R₃ 为 H 的式 I-II 的药物前体的实例包括其中一个羧基被酯化或两个羧基均被酯化 (例如被 C₁₋₆ 醇酯化) 或者相应的酰胺形式 (例如与 C₁₋₆ 胺形成) 的化合物。

本发明还涉及对于遭受编程性细胞死亡之苦的动物中编程性细胞死亡的抑制有响应的疾病的治疗方法。用于本发明方法的特别优选的化合物的实施方案是前面所定义的式 II 代表的化合物。

本发明的化合物可以利用本领域技术人员公知的方法制备。具体而言, 式 I-II 化合物可以按照方案 1 中举例说明的反应进行制备。按照 Revesz 等的方法 (四面体快报 35: 9693-9696, 1994) 制备中间产物 1。1 与 N-保护的氨基酸如 Z-Val-OH 偶合得到酰胺 2, 按照 Revesz 等的方法 (四面体快报 35: 9693-9696, 1994) 用 Dess-Martin 试剂将 2 氧化得到 3。该酯通过酸催化裂解得到游离酸 4, 再将 4 转化为酯 5。

方案 1





本发明的一个重要方面在于发现了式 I-II 化合物是编程性细胞死亡的强抑制剂。因此，预期这些抑制剂能在细胞、组织或整个器官发生损失的各种临床疾病中减慢或阻断细胞死亡。

本发明细胞死亡抑制剂可以在各种局部缺血和兴奋毒性疾病中用于减少或预防神经系统（脑、脊髓和周围神经系统）的细胞死亡，所述疾病包括但不限于因中风导致的病灶局部缺血和因心搏停止导致的普遍缺血。一个特定的用法是用于治疗高危分娩中新生儿出生过程中可能出现的缺氧。这些细胞死亡抑制剂还可以用于减少或预防因外伤性损伤（诸如头部创伤）、病毒感染或辐射诱导的神经细胞死亡（例如，作为癌症放疗的副作用）等导致的神经系统的细胞死亡。这些细胞死亡抑制剂还可以用于减少或预防神经变性疾病范围内的细胞死亡，所述疾病包括但不限于老年性痴呆、杭廷顿氏舞蹈病、帕金森氏症、多发性硬化、肌萎缩性侧索硬化和脊髓延髓萎缩。本发明细胞死亡抑制剂的体内神经保护性能可以用瞬时病灶局部缺血大鼠模型检验（Xue 等，*中风* 21: 166(1990)）。

本发明细胞死亡抑制剂可以用于预防可能导致心肌死亡的任何疾病中的细胞死亡。这些疾病包括心肌梗塞、充血性心力衰竭和心肌病。一个特定的应用是用于减少或预防心脏因某些病毒感染时发生的心肌细胞死亡。

本发明细胞死亡抑制剂的体内活性可以利用 Rodriguez 等（Rodriguez 等，*实验医学杂志* 184: 2067-2072(1996)）描述的“小鼠肝编程性细胞死亡”模型进行检验。在该模型中，给小鼠静脉注

射(IV)抗Fas抗体,该抗体能诱导肝脏和其他器官中大面积的编程性细胞死亡,从而导致普遍性器官衰竭和死亡。可以用该模型间接测试本发明细胞死亡抑制剂的系统性生物可利用率,以及它们的体内抗编程性细胞死亡性能。

本发明细胞死亡抑制剂可以用于预防眼内压升高疾病(诸如青光眼)或与老化过程有关的视网膜疾病(诸如年龄相关性黄斑变性)中可能发生的视网膜神经元的细胞死亡。这些抑制剂还可用于治疗遗传性视网膜变性疾病,诸如色素性视网膜炎。

本发明细胞死亡抑制剂还可用于减少或预防免疫系统细胞的过早死亡,特别是用于治疗免疫缺陷疾病,诸如获得性免疫缺陷综合征(AIDS),重症联合免疫缺陷综合征(severe combined immune deficiency syndrome, SCIDS)及相关疾病。这些细胞死亡抑制剂还可用于治疗辐射诱导的免疫抑制。

人的器官和组织移植是器官衰竭中常用的治疗方法。然而,在移植处置过程中,供体器官或组织有发生细胞死亡的危险,因为它们 在植入宿主之前失去了正常的血液供给。这种局部缺血状态可以通过给供体器官或组织输注细胞死亡抑制剂来进行治疗,或者通过将细胞死亡抑制剂直接加入到器官/组织储存介质中来进行治疗。细胞死亡抑制剂也可以用于减少或预防移植后供体器官/组织的细胞死亡,以保护它们不受通过触发编程性细胞死亡来杀死其目标的宿主免疫细胞的杀死作用。细胞死亡抑制剂的细胞保护作用还可用于预防体外授精过程中应用的人或动物精液和卵的死亡。这些抑制剂可以在收获过程中使用,也可以包括在储存介质中。

哺乳动物细胞系和酵母细胞常用于生产大量工业或药用的重组蛋白质(诸如抗体、酶或激素)。由于生长条件、所表达的重组分子的性质(一些是有毒的)以及其他未知因素的影响,有一些这样的细胞系的有效期限是有限的。通过在生长基中加入10-200mM浓度的细胞死亡抑制剂可以延长工业细胞系的有效期限。

调节毛发生长和损失的因素大多不明。然而,有一些证据表明,

毛囊退化（称为毛发生长中期）至少部分可归因于编程性细胞死亡。因此，预期本发明的细胞死亡抑制剂可用于治疗因各种疾病引起的脱发，所述疾病包括但不限于男性模式秃发、辐射诱导或化疗诱导的脱发、以及因情绪压力导致的脱发。还有证据表明，编程性细胞死亡在发色的减退中起作用。因此，预期本发明细胞死亡抑制剂还可用于治疗或预防头发过早斑白的情况。

接触高水平的辐射、热或化学物质后可发生皮肤上皮细胞死亡。预期本发明的细胞死亡抑制剂可用于治疗、减少或预防这种类型的皮肤损害。在一个特定的应用中，这些细胞死亡抑制剂可以以软膏的形式用于治疗皮肤严重阳光照射过度并预防皮肤起疱和脱皮。

Goldberg 等（*自然遗传学* 13: 442-449(1996)）最近报道，杭廷顿氏舞蹈病（HD）基因的蛋白产物 - 杭廷顿素（huntingtin）可以被 CPP32 而不是 ICE 裂解。HD 中的突变是 HD 基因 5'末端的 CAG 三核苷酸的扩展。该三核苷酸扩展超过 36 次重复与 HD 的临床表现有关。CAG 扩展促进了杭廷顿素被 CPP32 裂解，因此在 HD 中将 CPP32 的作用与编程性细胞死亡联系起来。本发明的具有 CPP32 抑制活性的化合物将可用于阻断 CPP32 诱导的编程性细胞死亡，由此预防和治疗 HD 以及其他以三核苷酸重复区的扩展为特征的疾病，诸如肌强直性营养不良、脆性 X 精神发育迟缓、脊髓延髓性肌萎缩、I 型脊髓小脑性共济失调和齿状核-红核苍白球丘脑下核萎缩。

本发明范围内的组合物包括其中包含本发明化合物的所有组合物，本发明化合物在其中的量足以达到其预期目的。尽管个体的需要不相同，但每种组份的最佳有效量范围的确定是本领域中的常规技术。一般说来，对哺乳动物例如人给药的化合物的口服剂量是 0.0025-50mg/kg 体重/天，或者是相当量的其药学上可接受的盐，体重是指进行治疗的患有编程性细胞死亡介导的疾病的哺乳动物的体重，所述疾病是例如神经细胞死亡、心脏病、视网膜疾病、多囊肾病和免疫系统疾病。优选以约 0.01-约 10mg/kg 的量口服给药，用于预防或治疗这些疾病。对于肌肉注射来说，剂量一般是口服剂

量的约二分之一。例如，治疗或预防神经细胞死亡时，合适的肌肉注射剂量应当是约 0.0025-约 15mg/kg，最优选为约 0.01-约 10mg/kg。

单位口服剂量可以包含约 0.01-约 50mg、优选约 0.1-约 10mg 化合物。单位剂量可以作为一个或多个片剂每天给药一次或多次，每片中含有约 0.1-约 10、通常为约 0.25-50mg 化合物或其溶剂化物。

除了作为生药给药该化合物以外，本发明化合物也可以作为含有合适的药学上可接受载体的药物制剂的一部分给药，所述载体包含有助于这些化合物加工成可药用制剂的赋形剂和助剂。优选的是，这些制剂，特别是可口服给药并可用于优选给药类型的那些制剂诸如片剂、糖衣丸和胶囊、可直肠给药的制剂诸如栓剂、以及通过注射或口服给药的合适的溶液剂，它们含有约 0.01-99%、优选约 0.25-75%的活性物质，和赋形剂。

本发明范围内还包括本发明化合物的无毒的药学上可接受的盐。将本发明的特定细胞死亡抑制剂的溶液与药学上可接受的无毒酸的溶液混合可形成酸加成盐，所述无毒酸是诸如盐酸、富马酸、马来酸、琥珀酸、乙酸、柠檬酸、酒石酸、碳酸、磷酸、草酸，等等。将本发明的特定细胞死亡抑制剂的溶液与药学上可接受的无毒碱的溶液混合可形成碱性盐，所述无毒碱是诸如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化胆碱、碳酸钠等。

本发明的药物组合物可以对能体验到本发明化合物有益效果的任何动物给药。这些动物中最重要的是哺乳动物，例如人，虽然本发明并不欲被局限在此。

本发明药物组合物可以用能达到其预期目的的任何方式给药。例如，可以通过胃肠外、皮下、静脉内、肌肉内、腹膜内、经皮的、面颊、鞘内或颅内途径给药。另外，或者并行地，可以通过口服途径给药。给药剂量将取决于接受者的年龄、健康状况和体重、并行治疗的种类（如果有的话）、治疗的频率、以及预期效果的性质。

本发明的药物制剂用已知方式制备，例如，利用常规的混合、制粒、包糖衣、溶解、或冷冻干燥方法。因此，口服的药物制剂可以用下述方法得到：将活性化合物与固体赋形剂混合，可选地研磨该所得混合物并加工该混合物颗粒，之后如果期望或需要的话，加入合适的助剂，由此制得片剂或糖衣丸芯。

合适的赋形剂尤其是填充剂，诸如糖类，例如乳糖或蔗糖，甘露糖醇或山梨糖醇，纤维素制剂和/或磷酸钙，例如磷酸三钙或磷酸氢钙，以及粘合剂诸如淀粉糊，例如使用玉米淀粉、小麦淀粉、稻米淀粉、马铃薯淀粉，明胶，黄芪胶，甲基纤维素，羟丙基甲基纤维素，羧甲基纤维素钠，和/或聚乙烯吡咯烷酮。如果需要，也可以加入崩解剂，诸如上面所提到的淀粉以及羧甲基淀粉，交联聚乙烯吡咯烷酮，琼脂，或藻酸或其盐，诸如藻酸钠。助剂尤其是流速调节剂和润滑剂，例如二氧化硅，滑石，硬脂酸或其盐，诸如硬脂酸镁或硬脂酸钙，和/或聚乙二醇。糖衣丸芯包上合适的包衣，如果需要，该包衣是抗胃液的。出于此目的，可以使用浓糖溶液，它可以可选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。为了制备抗胃液的包衣，可使用合适的纤维素制剂诸如乙酰纤维素邻苯二甲酸酯或羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯的溶液。例如，为了识别或为了描绘活性化合物剂量的组合特性，可以向片剂或糖衣丸包衣中加入染料或色素。

其他可口服使用的药物制剂包括明胶制成的推入配合式胶囊，以及由明胶和增塑剂诸如甘油和山梨醇制成的密封软胶囊。推入配合式胶囊可以含有颗粒形式的活性化合物，这些颗粒可以与填充剂诸如乳糖、粘合剂诸如淀粉、和/或润滑剂诸如滑石或硬脂酸镁以及可选地与稳定剂混合。在软胶囊中，活性化合物优选溶解或悬浮于适当的液体中，诸如脂肪油或液体石蜡。此外可以加入稳定剂。

可经直肠使用的可能的药物制剂包括，例如栓剂，它由一种或多种活性化合物的组合物以及栓剂基质组成。合适的栓剂基质是，例

如天然或合成甘油三酯，或石蜡烃。此外，也有可能使用由活性化合物与基质的混合物组成的明胶直肠胶囊。可能的基质材料包括，例如液体甘油三酯、聚乙二醇、或石蜡烃。

合适的胃肠外给药的制剂包括水溶性形式的活性化合物的水溶液，例如，水溶性盐和碱溶液。可以加入缓冲液例如 Tris。另外，也可以作为适宜的油性注射用悬液形式的活性化合物悬液给药。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油，例如芝麻油，或合成脂肪酸酯，例如油酸乙酯或甘油三酯或聚乙二醇-400（化合物可溶于 PEG-400）。含水注射用悬液可以含有能提高该悬液粘度的物质，包括例如羧甲基纤维素钠、山梨醇、和/或葡聚糖。可选地，该悬液还可含有稳定剂。

根据本发明的一个方面，本发明化合物以局部和胃肠外制剂形式使用，并用于治疗皮肤损伤，诸如因接触高水平的辐射，包括紫外线照射、热或化学物质引起的。

该组合物中还可加入对皮肤有治疗作用的一种或多种附加物质。因此，该组合物还可含有一种或多种能升高皮肤中环腺苷酸浓度的化合物。合适的化合物包括约 0.1-1%的腺苷或核酸水解产物，和约 0.5-5%的罂粟碱，二者均是基于组合物重量而言的重量百分数。约 0.1-2%的 β -肾上腺素能兴奋剂诸如异丙肾上腺素，或约 0.1-1%的环腺苷酸也是合适的，这二者也是基于组合物重量而言的重量百分数。可以加入到本发明组合物中的其他合适的附加活性成分的类型包括已知对皮肤具有有益效果的任何化合物。这样的化合物包括约 0.003-0.3 重量%的视黄类物质(retinoid)诸如维生素 A，和约 0.1-10 重量%的色原烷醇诸如维生素 E 或其衍生物，二者均基于组合物重量。此外，在化妆品组合物中可以加入抗炎剂和角质成形剂(keratoplastic agent)。典型的抗炎剂是诸如约 0.25-5 重量%的氢化可的松或其醋酸盐之类的皮质类固醇，或诸如约 0.025-0.5 重量%的地塞米松之类的皮质类固醇，二者均基于组合物的重量。典型的角质成形剂是约 0.1-20 重量%的煤焦油或约 0.05-2 重量

%的蒽地酚，二者均基于组合物重量。

通过选择适宜的载体，本发明的局部用组合物优选配制成油剂、膏霜、洗液、油膏等。合适的载体包括植物油或矿物油，白凡士林（白软石蜡），支链脂肪或油，动物脂肪以及高分子量醇（大于 C_{12} ）。优选的载体是可溶解活性成分的那些。如果需要，还可以包括乳化剂、稳定剂、湿润剂和抗氧化剂，以及可以产生颜色或香味的试剂。另外，在这些局部用制剂中可以使用经皮渗透增强剂。在美国专利 3,989,816 和 4,444,762 中可以找到这种增强剂的例子。

膏霜优选用矿物油、自乳化蜂蜡和水的混合物制备，在该混合物中混合有溶解于少量油诸如杏仁油中的活性成分。这种膏霜的一个典型实例是包括约 40 份水、约 20 份蜂蜡、约 40 份矿物油和约 1 份杏仁油的膏霜。

油膏可以用下述方法制备：将活性成分在植物油诸如杏仁油中的溶液与温热软石蜡混合并使该混合物冷却。这种油膏的一个典型实例是包括约 30 重量%的杏仁油和约 70 重量%的白色软石蜡的油膏。

洗液可以用下述方法方便制备：将活性成分溶解于合适的高分子量醇诸如丙二醇或聚乙二醇中。

另外，这些组合物中可以包括本领域技术人员公知或明了的其他药剂、生长因子、伤口密封剂、载体等。本发明组合物对已遭受皮肤损伤诸如烧伤的温血动物诸如人给药，其用量足以使宿主的愈合过程比未经治疗时进展得更快。关于这种用途的有效量将取决于所治疗患者的皮肤损害的严重程度以及该患者的一般健康状态。长期应用的维持剂量可以根据需要进行调整。对于兽医用途来说，可以根据需要以更高的浓度给药。

当动物的毛发生长减少时，本发明组合物以足以提高毛发生长速率的量给药。关于这种用途的有效量将取决于所治疗患者的毛发生长减少的程度，以及该患者的一般健康状态。长期应用的维持剂量可以根据需要进行调整。对于兽医用途来说，可以根据需要以更高的水平给药。

以下实施例说明而不限本本发明的方法和组合物。临床治疗中正常遇到的各种条件和参数的其他适当的改进和变化以及对本领域技术人员来说显而易见的各种改进和变化均在本发明的实质和范围内。

实施例 1

5-氟-4-羟基-3-硝基戊酸叔丁酯

将存在于干燥 CH_2Cl_2 (100mL) 中的草酰氯 (1.9mL, 21.8mmol) 溶液冷却至 -78°C , 边搅拌边加入存在于干燥 CH_2Cl_2 (10mL) 中的 DMSO (3.0mL, 42.3mmol) 溶液, 加入速率应使温度保持在 $-50^\circ\text{C} - -60^\circ\text{C}$ 。搅拌 5 分钟后, 加入存在于干燥 CH_2Cl_2 (10mL) 中的 2-氟乙醇 (1.2mL, 18.4mmol) 溶液, 继续搅拌 15 分钟, 然后加入干燥 Et_3N (13.5mL)。该反应混合物搅拌 15 分钟, 然后使其恢复到室温。向该反应混合物中加入 3-硝基丙酸叔丁酯 (2.87g, 16.38mmol) 的 CH_2Cl_2 溶液 (20mL)。该反应混合物在室温下搅拌 3 小时, 然后倒入水 (100mL) 中。分离有机层, 水层用 CH_2Cl_2 (2 × 50mL) 萃取。该 CH_2Cl_2 溶液用盐水洗涤、干燥并蒸发。残余物用硅胶柱色谱法 (己烷-EtOAc, 7:3) 纯化两次, 得到 950mg (24.5%) 标题产物, 为无色粘性油。

^1H NMR (CDCl_3), 1.450 (s, 9H), 2.80-2.90

(m, 2H), 3.12-3.20 (m, 1H), 4.41-4.59 (m, 2H), 4.57-4.59 (m, 1H), 4.95-5.01

(m, 1H).

实施例 2

3-氨基-5-氟-4-羟基-戊酸叔丁酯

向 5-氟-4-羟基-3-硝基戊酸叔丁酯 (950mg, 4.0mmol) 的 MeOH 溶液 (20mL) 中加入阮内镍 (约 200mg), 该混合物在室温和 H_2 (30-35psi) 下振摇 18 小时。将其过滤, 催化剂用 MeOH (2 × 10mL) 洗涤。将 MeOH 溶液蒸发, 残余物用硅胶柱色谱法纯化 (EtOAc-MeOH, 10:1), 得到 840mg (96%) 标题化合物, 为淡黄色粘性油。

^1H NMR (CDCl_3), 1.450 (s, 9H), 2.12 (bs, 3H, OH 和

NH_2), 2.28-2.38 (m, 1H), 2.47-2.57 (m, 1H), 3.24-3.30 (m, 1H), 3.54-3.76 (m,

1H), 4.38-4.48 (m, 1H), 4.54-4.61 (m, 1H).

实施例 3

3-(Cbz-Val-酰胺基)-5-氟-4-羟基-戊酸叔丁酯

向 Cbz-缬氨酸(396mg, 1.58mmol)的 THF 溶液(20mL)中加入 EDCI(300mg, 1.57mmol)、HOBT(240mg, 1.57mmol)和 DMAP(129mg, 1.06mmol)。所得混合物搅拌 5 分钟, 然后加入 3-氨基-5-氟-4-羟基-戊酸叔丁酯(215mg, 1.04mmol)的 THF 溶液(10mL), 并将其在室温下搅拌 18 小时。将混合物过滤, 蒸发 THF 溶液, 残余物用硅胶柱色谱法纯化(己烷-EtOAc, 3:2), 得到 290mg(68%)标题化合物, 为白色固体。

^1H NMR (CDCl_3), 0.905 (d, 3H, J=7), 0.965 (d, 3H, J=7), 1.428 (s, 9H), 2.07-2.16 (m, 1H), 2.50-2.57 (m, 1H), 2.64-2.70 (m, 1H), 3.52 (bs, 1H, OH), 3.92-3.96 (m, 2H), 4.20-4.27 (m, 1H), 4.40 (bs, 1H), 4.49 (bs, 1H), 5.10 (s, 2H), 5.31-5.4 (m, 1H, NH), 6.86-6.93 (m, 1H, NH), 7.350(s, 5H).

实施例 4

Z-Val-Asp-Fmk 叔丁酯

向 periodinane(485mg, 1.14mmol)的 CH_2Cl_2 乳液(imussion)(20mL)中加入 3-(Cbz-Val-酰胺基)-5-氟-4-羟基-戊酸叔丁酯(230mg, 0.52mmol)的 CH_2Cl_2 溶液(12mL), 所得白色混合物在室温下搅拌 40 分钟, 然后倒入 25mL 含有 1.26g(8mmol) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的饱和 NaHCO_3 水溶液中。所得混合物搅拌 20 分钟, 将所得澄清 CH_2Cl_2 溶液分离, 水层用 CH_2Cl_2 (2×25mL)萃取。 CH_2Cl_2 溶液用盐水洗涤并蒸发, 残余物用硅胶柱色谱法纯化(己烷-EtOAc, 3:2), 得到 190mg(83%)标题化合物, 为白色固体。 ^1H NMR (CDCl_3), 0.91-0.97 (m, 6H), 1.415 (s, 9H), 2.10-2.20 (m, 1H), 2.70-2.77 (m, 1H), 2.95-3.01 (m, 1H), 3.98-4.06 (m, 1H), 4.87-5.28 (m, 6H), 6.95-7.01 (m, 1H), 7.350 (s, 5H).

实施例 5

Z-Val-Asp-fmk

向 *Z-Val-Asp-fmk* 叔丁酯 (180mg, 0.41mmol) 的干燥 CH_2Cl_2 溶液 (5mL) 中加入 $\text{F}_3\text{CCO}_2\text{H}$ (1.0mL), 其在室温下搅拌 40 分钟, 然后蒸发。残余物用硅胶柱色谱法纯化 (EtOAc-MeOH , 10:1), 得到 120mg (76%) 标题化合物, 为白色固体。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6), 0.81-0.84 (m, 6H), 1.87-1.96 (m, 1H), 2.47-2.67 (m, 2H), 3.77-3.87 (m, 1H), 4.47-4.59 (m, 1H), 4.91-5.16 (m, 4H), 7.25-7.42 (s, 5H), 8.40-8.49 (m, 1H).

利用实施例 3 - 5 中描述的相同方法制得下列化合物:

实施例 6

Z-Leu-Asp-fmk

白色固体。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), 0.87 (m, 6H), 1.11 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.81 (m, 1H), 2.7 (m, 1H), 2.95 (m, 1H), 4.10 (m, 1H), 4.80-5.20 (m, 6H), 7.31 (s, 5H).

实施例 7

Z-Ile-Asp-fmk

白色固体。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3), 0.85-0.96 (m, 6H), 1.14-1.26 (m, 1H), 1.422 (s, 9H), 1.87-2.04 (m, 1H), 2.70-2.77 (m, 2H), 2.93-3.00 (m, 1H), 4.02-4.13 (m, 1H), 4.80-5.30 (s, 6H), 6.96 (m, 1H), 7.35 (s, 5H).

实施例 8

Z-Ala-Asp-fmk

白色固体。 $^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6), 1.160 (d, 3H, $J=7$), 2.54-2.70 (m, 2H), 4.00 (m, 1H), 4.54 (m, 1H), 5.10-5.30 (m, 3H), 7.235 (s, 5H), 8.46-8.52 (m, 1H).

实施例 9

Ac-Val-Asp-fmk

白色固体。¹H NMR (DMSO-d₆), 0.80-0.84 (m, 6H), 1.85-1.97 (m, 4H), 2.56-2.75 (m, 2H), 4.00-4.45 (m, 4H), 5.00-5.30 (m, 2H), 7.85-8.00 (m, 1H), 8.53-8.60 (m, 1H).

实施例10

Z-N-Me-Val-Asp-fmk

白色固体。¹H NMR (DMSO-d₆), 0.765 (d, 3H, J=7), 0.832 (d, 3H, J=7), 2.06 (m, 1H), 2.57-2.85 (m, 5H), 4.21 (m, 1H), 4.63 (m, 1H), 5.02-5.18 (m, 4H), 7.337 (s, 5H), 8.850 (m, 1H).

实施例11

Z-Ala-Asp-fmk

白色固体。¹H NMR (DMSO-d₆), 2.30 (t, 2H, J=7), 2.48-2.70 (m, 3H), 3.17 (m, 2H), 4.41-4.60 (m, 2H), 4.98-5.30 (m, 3H), 5.40 (m, 1H), 6.63 (m, 1H), 7.32 (s, 5H), 8.52 (m, 1H).

实施例12

Z-Gly-Asp-fmk

白色固体。¹H NMR (DMSO-d₆), 12.50 (s, 1 H), 8.49 (m, 1 H), 7.52 (m, 1 H), 7.33 (s, 5 H), 5.08-5.25 (m, 1 H), 5.01 (s, 2 H), 4.10 (m, 1 H), 3.63 (d, J = 6.0 Hz, 2 H), 2.50-2.80 (m, 2 H).

实施例13

Z-Phe-Asp-fmk

白色固体。¹H NMR (DMSO-d₆), 8.60 (m, 1 H), 7.60 (m, 1 H), 7.24-7.30 (m, 10 H), 4.92 (m, 3 H), 4.60 (m, 1 H), 4.28 (m, 1 H), 2.90 (m, 2 H), 2.70 (m, 2 H).

实施例 14

Z-Glu-Asp-fmk

白色固体。¹H NMR (DMSO-d₆), 12.20 (m, 1 H), 8.48 (m, 1 H), 7.56 (m, 1 H), 7.34 (m, 5 H), 5.12 (m, 1 H), 5.01 (s, 2 H), 4.51 (m, 1 H), 3.95 (m, 1 H), 2.71 (m, 2 H), 2.24 (m, 2 H), 1.72-1.82 (m, 2 H).

实施例 15

Z-Pro-Asp-fmk

白色固体。¹H NMR (CD₃OD): 7.36-7.33 (m, 5 H), 5.13-5.11 (m, 2 H), 4.30 (s, 1 H), 3.58-3.50 (m, 2 H), 2.77-2.64 (m, 2 H), 2.24 (m, 1 H), 1.94 (s, 2 H).

实施例 16

Z-His-Asp-fmk

白色固体。¹H NMR (CD₃OD): 8.78 (s, 1 H), 7.93 (s, 1 H), 7.36-7.33 (m, 7 H), 5.52 (s, 2 H), 5.10 (s, 2 H), 4.49 (s, 1 H), 3.13-3.05 (m, 2 H), 2.84 (s, 2 H).

实施例 17

Z-Tyr-Asp-fmk

如实施例 3 和 4 中所述, 从 *Z-Tyr(Bu-t)-OH* 和 3-氨基-5-氟-4-羟基戊酸叔丁酯制备 *Z-Tyr(Bu-t)-Asp-fmk* 叔丁酯。向 *Z-Tyr(Bu-t)-Asp-fmk* 叔丁酯 (15mg, 0.027mmol) 的二氯甲烷溶液 (1mL) 中加入 TFA (1mL)。该混合物在室温下搅拌 8 小时, 然后在 4℃ 下搅拌 2 天。用乙酸乙酯 (30mL) 将其稀释, 用水 (4 × 20mL) 和盐水洗涤, 用硫酸钠干燥并真空浓缩, 得到黄色固体标题化合物 (10mg, 0.022mmol, 83%)。¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 9.20 (s, 1H), 8.50 (br s, 1H), 7.50 (m, 1H), 7.32-7.03 (m, 7H), 6.63 (d, *J* = 7.5, 2H), 4.94 (s, 2H), 4.55 (m, 1H), 4.15 (m, 1H), 2.90-2.60 (m, 4H)。

实施例 18

Z-Val-Asp-fmk 甲酯

向在冰浴中冷却的 *Z-Val-Asp-fmk* (110mg, 0.28mmol) 的 MeOH 溶液 (20mL) 中缓慢通入 HCl 气流, 直到用 pH 试纸测定该溶液已变为强酸性。该溶液在室温下搅拌 4 小时, 然后蒸发。残余物用硅胶柱色谱法纯化 (己烷-EtOAc, 3:2), 得到 63mg (55%) 标题化合物, 为白色固体。¹H NMR (CDCl₃): 0.91-0.87 (m, 6H), 2.10-2.20 (m, 1H), 2.81-2.88 (m, 1H), 3.02-3.08 (m, 1H), 3.675 和 3.682 (2S, 3H), 3.97-4.01 (m, 1H), 4.90-5.25 (m, 6H), 6.94-7.02 (m, 1H), 7.354 (s, 5H)。

利用实施例 18 中描述的相同方法制得下列化合物。

实施例 19

Z-Leu-Asp-fmk 甲酯

无色粘性油。 ^1H NMR (CDCl_3), 0.92-0.94 (m, 6H), 1.25-1.80 (m, 4H), 2.78-2.82 (m, 1H), 3.00-3.05 (m, 1H), 3.675 (s, 3H), 4.15-4.20 (m, 1H), 4.85-5.10 (m, 6H), 7.10-7.20 (m, 1H), 7.344 (s, 5H).

实施例 20

Z-Ile-Asp-fmk 甲酯

白色固体。 ^1H NMR (CDCl_3), 0.85-0.96 (m, 6H), 1.14 (m, 1H), 1.46 (s, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.91-2.86 (m, 1H), 2.88-3.02 (m, 1H), 3.257 (s, 3H), 4.68-4.06 (m, 1H), 4.80-5.30 (s, 6H), 6.99 (m, 1H), 7.35 (s, 5H).

实施例 21

用 *HeLa* 细胞进行的细胞死亡试验

利用用肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和环己酰亚胺 (CHX) 刺激的 *HeLa* 细胞测试 Cbz-Val-Asp(OMe) CH_2F 的细胞保护性能。这是编程性细胞死亡的一种已很好表征的细胞培养物模型，它通常用于分析抗编程性细胞死亡试剂。进行两种类型的实验：利用相差显微镜检查观察细胞而定性评估细胞死亡；和利用荧光染料钙黄绿素 AM 定量评估细胞死亡。

对于光显微镜检查，将 *HeLa* 细胞以 100000 细胞/孔的密度接种到 12 孔板中的、含有 2mM 谷氨酰胺和 10% 胎牛血清的基本培养基中。24 小时后，将该铺板培养基除去，加入含有不同浓度的细胞保护测试化合物的新鲜培养基。这些细胞在 37°C 下在 CO_2 恒温箱中与测试化合物预培养 2 小时，然后加入 TNF- α 和 CHX，使终浓度分别为 25ng/mL 和 30 $\mu\text{g/mL}$ 。培养 24 小时后，通过视觉检验这些细胞，以获得基于细胞形状和粘着度的细胞死亡的证据。如果细胞已变圆、相位明亮且已经与基层分离，就认为细胞已死亡。如果细胞仍保持它们的正常形状且与基层维持附着，就认为细胞仍活着。

对于定量试验来说，利用指示剂染料钙黄绿素 AM 定量分析在测试化合物存在下的细胞存活度。活细胞摄入该染料并将其转化为荧

光衍生物；然后用荧光板读数器测定每孔中活化染料的量，用荧光度作为存活细胞数量的量度。为进行这些试验，将Hela细胞以25000细胞/孔的密度接种到48孔板中的、含有2mM谷氨酰胺和10%胎牛血清的0.4mL基本培养基中。24小时后，除去铺板培养基，加入含有不同浓度测试化合物的0.5mL新鲜培养基。这些细胞在37℃下在CO₂恒温箱中与测试化合物预培养2小时，然后加入TNF-α和CHX，使终浓度分别为25ng/mL和30μg/mL。培养24小时后，将培养物用无血清、无酚红的Ham's F12洗涤两次，以除去死亡细胞，并加入125μL含有8μM钙黄绿素AM的Ham's F12。该培养物在室温下培养1小时，利用使用485nm(激发)和530nm(发射)过滤器装置的BioTek平板读数器测定荧光信号。数据以“相对对照百分数”表示，它用下列公式计算：

$$\text{相对对照百分数} = \frac{\text{测试化合物} + \text{TNF-}\alpha \text{和CHX存在下的钙黄绿素AM信号}}{\text{仅有CHX存在下的钙黄绿素AM信号}}$$

将用CHX处理的培养物作为对照，而不是用未处理的培养物作为对照，以修正CHX的细胞抑制作用。不过，由于CHX自身也是Hela细胞的编程性细胞死亡的轻度诱导剂，强抗编程性细胞死亡药物将得到大于100%的相对对照百分数值。

典型的定性试验结果显示在图1A-1G，2A-2G和3A-3G中。在这些实验中，将Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F的细胞保护效能与BOC-Asp(OMe)-CH₂F、Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F、和Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F在三个不同浓度：0.5、5和50μM下进行对比。所有这些化合物均是甲酯衍生物。图1A-1G显示：在50μM浓度下，Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F(图1D)完全保护了Hela细胞免受TNF-α和CHX的编程性细胞死亡作用。在50μM时，相关肽BOC-Asp(OMe)-CH₂F(图1C)和Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F(图1E)也是保护剂。CPP32抑制剂Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F(图1F)在50μM时仅是

勉强有效的细胞保护剂。图 2A-2G 显示, 在 $5\mu\text{M}$ 浓度下, Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (图 2D) 仍令人惊奇地显示出强细胞保护作用, 而 $5\mu\text{M}$ BOC-Asp(OMe)-CH₂F (图 2C) 和 $5\mu\text{M}$ Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F (图 2E) 的效果较差。CPP32 抑制剂 Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F (图 2F) 在 $5\mu\text{M}$ 时没有细胞保护性能。图 3A-3G 显示, 即使在 $0.5\mu\text{M}$ 下, Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (图 3D) 仍是有效的细胞保护剂, 而其他化合物(图 3C、3E 和 3F) 只有轻微的或是没有细胞保护作用。这些实验证明, Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 可在比其他推测的抗编程性细胞死亡剂低 10-100 倍的浓度下保护 Hela 细胞不受 TNF- α /CHX 诱导的编程性细胞死亡。

如上所述, 利用钙黄绿素 AM 进行的定量实验证实了用显微镜检验得到的结果。图 4 和 5 说明了两个这样的实验结果, 其中将 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (a) 的细胞保护性能与 BOC-Asp(OMe)-CH₂F (b) (图 5) 和 Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F (c) (图 4) 在三种浓度 (0.5 、 5 和 $50\mu\text{M}$) 下进行对比。图 4 显示, Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F (b) 即使以最高浓度 ($50\mu\text{M}$) 使用, 它在保护 Hela 细胞不受 TNF- α /CHX 伤害中也只有最小限度的功效。图 5 显示, 50 和 $5\mu\text{M}$ 的 BOC-Asp(OMe)-CH₂F (b) 是有效的细胞保护剂, 但在 $0.5\mu\text{M}$ 时, 其活性显著降低。相比之下, $0.5\mu\text{M}$ 的 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (a) 作为细胞保护剂与 $50\mu\text{M}$ 的 Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F (b) 功效相同(图 4)。另外, $0.5\mu\text{M}$ 的 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (a) 是高活性的, 而 $0.5\mu\text{M}$ 的 BOC-Asp(OMe)-CH₂F (b) 没有活性(图 5)。

为了确定低剂量的 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 的效果, 用 $0.05\mu\text{M}$ - $1\mu\text{M}$ 浓度范围内的该化合物处理 Hela 细胞。如图 6 所示, 在低至 $0.25\mu\text{M}$ 浓度时, Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F (a) 产生了显著的保护作用。相比之下, 在细胞死亡研究中广泛使用的抗编程性细胞死亡剂 Cbz-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F (b) 在此浓度范围内显示没

有细胞保护作用。

合起来看,从图 1A 到图 6 说明的这些实验显示,Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 是完整细胞的令人惊奇的强抗编程性细胞死亡剂,它比其他任何已知的 caspase 抑制剂的作用都强。

实施例 22

抑制 Jurkat 细胞中的 PARP 裂解

聚(ADP)核糖聚合酶(PARP)的裂解可能发生在其中 caspase 蛋白水解级联反应被激活的所有细胞中。出于这种原因,PARP 裂解被广泛用作 caspase 介导的编程性细胞死亡的生化标记。细胞保护药物阻断 PARP 裂解的能力被认为是药物抑制 caspase 蛋白水解级联反应能力的象征,特别是抑制 CPP32(caspase-3)这种主要的 PARP 蛋白酶的能力的象征。在一种人 T 细胞系 - Jurkat 细胞的 Fas 介导的编程性细胞死亡过程中检验 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 抑制 PARP 裂解的能力。这种编程性细胞死亡的细胞培养物模型的特性已被较好地描述,并且已知它与至少两种 caspase(caspase-3(CPP32)和 caspase-8(FLICE/MACH))的活化有关。

对于 PARP 裂解测定来说,将 Jurkat 细胞以 500000 细胞/孔的密度接种到六孔板中的含有 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基中。这些细胞在 37℃ 下在 CO₂ 恒温箱中与 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 或其他测试化合物预培养 2 小时,然后加入 Fas 的单克隆抗体,使终浓度为 500ng/mL。在 37℃ 下在 CO₂ 恒温箱中继续再培养 4 小时。培养期结束时,通过离心收获这些细胞并在含有 50mM Tris-HCl, pH7.4、150mM NaCl、1% NP-40、0.25%脱氧胆酸钠、1mM EDTA 和蛋白酶抑制剂混合物的缓冲液中裂解。将相当于 10-20μg 蛋白质的适量裂解物加样到 7.5% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上,在 25mA 下电泳 2-2.5 小时。然后将蛋白质转移到 PVDF 膜上,用 PARP 的兔多克隆抗体进行探测,并利用化学萤光法观察。

图 7A-7E 显示了三个这样的实验的结果。Jurkat 细胞用 0.5、5

或 50 μ M 的下列化合物预培养: Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 1); BOC-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 5); Cbz-Asp- α -([2, 6-二氯苯甲酰氧基]-甲基酮(化合物 6); Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 3); Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 2); Cbz-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 4); 或 Cbz-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 7)。然后这些细胞用抗 Fas 处理并进行蛋白质印迹分析。Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 1) 在 50 μ M 和 5 μ M 时完全抑制了 PARP 裂解, 甚至在 0.5 μ M 时也显著抑制裂解(图 7A)。相比之下, Cbz-Asp(OMe)-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 2)(图 7A) 和 Cbz-Ile-Glu(OMe)-Thr-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 4)(图 7C) 以及 Cbz-Asp-DCB(化合物 6)(图 7D) 在 50 μ M 时完全抑制了 PARP 裂解, 但在 5 μ M 和 0.5 μ M 时仅是勉强有效的抑制剂。BOC-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 5)(图 7D) 和 Cbz-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 7)(图 7E) 以及 Cbz-Glu(OMe)-Val-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 3)(图 7B) 在 50 μ M 和 5 μ M 时是 PARP 裂解的有效抑制剂, 但在 0.5 μ M 时仅勉强有效, 而在此浓度下, Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F(化合物 1) 仍显示出明显的抑制作用(图 7A)。这些实验证明, Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 可在比其他已知 caspase 抑制剂低至少 10 倍的浓度下阻断完整细胞中的 caspase 蛋白水解级联反应。

实施例 23

酶活性

用荧光酶试验测定 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 和 Cbz-Val-Asp-CH₂F(游离酸)作为 CPP32、ICE 和组织蛋白酶 B 的抑制剂的活性。通过利用杆状病毒作为载体, 在昆虫宿主细胞(sf9 细胞)中表达编码这些酶的 DNA 克隆, 制备重组 CPP32 蛋白质和 ICE 蛋白质。参见 Webb, N. R. 等, “利用重组杆状病毒表达蛋白质”, 工艺方法(*Techniques*) 2: 173-188(1990)。天然组织蛋白酶的制剂从商业

来源获得。酶活性利用附着于荧光离去基的合成肽底物进行测定。酶对合成底物的裂解产生荧光信号，其用分光荧光计或用荧光微量滴定板读数器读数。

CPP32 活性利用下列缓冲条件进行测量：100mM HEPES pH7.5，加有 10%蔗糖，1% CHAPS，5mM 谷胱甘肽和 5 μ M 肽底物。肽底物由具有序列 Asp-Glu-Val-Asp 的低聚物和与 C 末端缀合的荧光化合物氨基甲基香豆素组成。酶活性测定通常在 37 $^{\circ}$ C 下进行 30 分钟。

表 I 列出了 Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 和 Cbz-Val-Asp-CH₂F (游离酸) 对 CPP32 和其他蛋白酶的 IC₅₀。

表 I: Cbz-Val-Asp(OMe)-CH₂F 和 Cbz-Val-Asp-CH₂F (游离酸) 作为 CPP32 和其他蛋白酶的抑制剂的效能

酶	Cbz-Val-Asp(OMe)-CH ₂ F IC ₅₀ (μ M)	Cbz-Val-Asp-CH ₂ F (游离酸) IC ₅₀ (μ M)
CPP32	1.1	0.043
ICE	0.9	0.02
组织蛋白酶 B	0.3	>10
Xa 因子	>100	>100
凝血酶	>100	>100

表 I 中显示的结果表明，本发明化合物是 CPP32 和 ICE 的中等强度的抑制剂。结果还表明，Cbz-Val-Asp-CH₂F 是 CPP32 和 ICE 的强抑制剂和选择性抑制剂。

Cbz-Val-Asp-CH₂F 对从 PharMington(Becton 分公司，San Diego, CA)得到的重组 caspase 3、6、7 和 8 的抑制活性利用 Ac-DEVD-AMC 测定。每个试验中的每种酶的用量如下：1ng caspase3，15ng caspase6，2ng caspase7 和 60ng caspase8。酶反应在 96 孔板中利用 caspase 缓冲液 (20mM PIPES, 100mM NaCl, 10mM DTT, 1mM EDTA, 0.1%CHAPS 和 10%蔗糖, pH7.2) 进行，该反应通过加入 10 μ M Ac-DEVD-AMC (购自 Quality Controlled Biochemicals, Inc. Hopkinton, MA) 引发。从 30pM 到 10 μ M 的 12 种浓度的 Cbz-Val-

Asp-CH₂F 化合物在与重组 caspase 于 37℃ 下孵育 30 分钟后进行测试。用采用 355nm 激发过滤器/460nm 发射过滤器的荧光板读数器 (EC&G WALLAG, 1420-002 型) 对该板读数。数据利用 GraphPrism 软件进行分析。数据总结于表 II 中。

表 II: Cbz-Val-Asp-CH₂F 作为 caspase 抑制剂的效能

	Caspase-3	Caspase-6	Caspase-7	Caspase-8
IC ₅₀ (nM)	19.8	18.4	6.8	7.2

表 II 中显示的结果表明, Cbz-Val-Asp-CH₂F 是所有被测试 caspase 的强抑制剂。

表 III 显示了各种二肽抑制剂对 caspase-3 的活性。结果表明, 在所测试的化合物中, Z-Val-Asp-CH₂F 是最强的 caspase-3 抑制剂。

表 III. 二肽抑制剂的 Caspase-3 活性

名称	Caspase-3 IC ₅₀ (μM)
Z-L-Val-Asp-fmk	0.04
Z-L-Leu-Asp-fmk	0.2
Z-L-Ile-Asp-fmk	0.7
Z-L-Phe-Asp-fmk	0.4
Z-Gly-Asp-fmk	1.9
Z-L-Ala-Asp-fmk	0.6
Z-β-Ala-Asp-fmk	3.5
Ac-L-Val-Asp-fmk	0.25
Z-L-Glu-Asp-fmk	14.2
Z-L-Lys-Asp-fmk. TFA	1.6
Z-N-Me-L-Val-Asp-fmk	1.3
Z-L-Pro-Asp-fmk	0.41
Z-L-His-Asp-fmk	0.77
Z-L-Tyr-Asp-fmk	0.66

实施例 24

Z-VD-fmk 对 PARP 裂解的作用

聚(ADP)核糖聚合酶 (PARP) 是首先确定的 caspase-3 底物之一, PARP 的裂解仍被认为是 caspase-3 活化和 caspase 介导的编程性细胞死亡的近似通用标记。因此, 抗编程性细胞死亡化合物阻断 PARP 裂解的能力是其抑制编程性细胞死亡能力的有用的指示。利用抗 Fas 处理的 Jurkat 细胞来检验 *Z-VD-fmk* 在 PARP 裂解试验中的效能。将 2×10^6 Jurkat 细胞接种到 6 孔皿的每一个孔中, 并用测试化合物预培养 30 分钟。然后这些细胞用 500ng/mL 兴奋性抗 Fas 抗体或 PBS 刺激 4 小时。之后收获这些细胞, 轻柔地使它们成团, 用 PBS 洗涤两次, 并使其在 RIPA 缓冲液中裂解。等分的裂解液用 SDS-PAGE 进行分析, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上进行蛋白质印迹分析。一抗是与全长 PARP 和 caspase-3 生成的裂解产物均有交叉反应的多克隆抗 PARP 血清。

图 8A 显示, *Z-VD-fmk* 在 500 和 250nM 浓度时完全抑制了 PARP 裂解 (注意没有 85KDa 带)。 *Z-VD-fmk* 的浓度即使低至 50nM 时仍保持了其大部分抑制活性 (图 8A)。相比之下, 尽管 *Z-VAD-fmk* 在 5 μ M 浓度时是 PARP 裂解的有效抑制剂 (数据未显示), 但其效率在 500nM 时要小得多 (图 8B)。这些实验显示, *Z-VD-fmk* 作为完整细胞中 PARP 裂解抑制剂的效能比 *Z-VAD-fmk* 高至少 10 倍, 在这种完整细胞编程性细胞死亡模型中, *Z-VD-fmk* 的 IC₅₀ 值小于 50nM。

实施例 25

Z-VD-fmk 对 TNF- α 诱导的细胞死亡的作用

肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 可以在大量细胞类型中通过启动 caspase 级联反应而引发编程性细胞死亡, 其编程性细胞死亡诱导活性可以被肽基 caspase 抑制剂抑制。不过, 要产生良好的抗编程性细胞死亡作用, 必需要高浓度的抑制剂 (50 μ M 或更高)。这里用 TNF- α 细胞死亡研究中常用的细胞系 - HeLa 细胞来确定 *Z-VD-fmk*

的抗编程性细胞死亡效能。

在处理前 24 小时，将 HeLa 细胞以 50000 细胞/孔的密度接种到 48 孔板中。然后将它们用不同浓度的 Z-VD-fmk 预培养 2 小时，并用 TNF- α (25ng/mL) 和环己酰亚胺 (CHX; 30 μ g/mL) 进行刺激。将该培养物再培养 24 小时，用 PBS 洗涤两次除去死亡细胞。每份培养物再用钙黄绿素 AM (钙黄绿素 AM 是一种前荧光染料，它被活细胞摄入并转化为荧光产物) 培养 45 分钟，由此测量存活细胞的密度。所得数据用“%相对对照”值表示 (对照值是与环己酰亚胺、但无 TNF- α 一起温育的细胞得到的值)。

图 9 显示了从 0 到 500nM 测试浓度范围内的 Z-VD-fmk 的结果。Z-VD-fmk 在浓度接近 100nM 时产生了良好的细胞保护作用。相比之下，Z-VAD-fmk 在低于 1 μ M 时失去了其大部分细胞保护性能 (数据未显示)。四肽抑制剂，诸如 Z-DEVD-fmk 和 Ac-DEVD-CHO，在低于 50 μ M 时效率非常低 (数据未显示)。因此，Z-VD-fmk 不仅在亚微摩尔浓度水平抑制 PARP 裂解 (参见实施例 24)，而且在亚微摩尔浓度水平抑制细胞死亡，它比已知的三肽和四肽抑制剂有效得多。

实施例 26

Z-VD-fmk 对 DNA 梯状化的作用

在编程性细胞死亡的后期，随着细胞质碎片脱散 (通过起泡) 和核分解，细胞开始完全崩溃。核分解的证据之一是基因组 DNA 裂解成核小体大小的片段 (叫做“DNA 梯状化”)。DNA 梯状化象其他后期编程性细胞死亡事件一样，被认为是不可逆的，因此确定抗编程性细胞死亡药物是否能预防其发生是很重要的。

Z-VD-fmk 阻断 DNA 梯状化的能力利用抗 Fas 处理的 Jurkat 细胞进行检验。将 Jurkat 细胞以 5×10^6 细胞的密度铺板到 60mm 培养皿中，并用不同浓度的 Z-VD-fmk 预培养。然后它们用 100ng/mL 的抗 Fas 刺激 4 小时，将它们收获，使之成团并用 PBS 洗涤两次。基因组 DNA 利用 Eldadah 等 (1996) 的方法进行分离。简单地说，将细

胞溶解于 2mL 7M 盐酸胍中并与 1mL Wizard 小量制备 DNA 纯化树脂 (Promega) 混合。该树脂/DNA 复合物用缓冲液洗涤两次, DNA 用 TE 洗脱。将 1-2 μ g 的该 DNA 样品在 1%琼脂糖/TBE 凝胶上电泳, 该凝胶用溴化乙锭染色。

图 10 显示了 DNA 梯状化试验的结果, 其中细胞用 Z-VD-fmk 或药物载体 (DMSO) 预培养。用抗 Fas 刺激的载体处理细胞显示了 DNA 的特征性梯状化模式, 它向下扩展到约 300bp。相比之下, Z-VD-fmk 的剂量低至 50nM 时抑制了梯状化形成。

这一结果显示, Z-VD-fmk 可在相当于阻断细胞死亡和 PARP 裂解的浓度的亚微摩尔浓度下阻断危险的后期编程性细胞死亡 (DNA 梯状化)。基于此实验和实施例 24 和 25 中描述的数据可以得出结论: Z-VAD-fmk 是编程性细胞死亡的完整细胞模型的高效、亚微摩尔编程性细胞死亡抑制剂。

实施例 27

Cbz-Val-Asp-CH₂F 在小鼠肝编程性细胞死亡模型中的 抗编程性细胞死亡活性

该研究中使用 3-4 周龄的雌性小鼠。通过静脉注射 2-6 μ g 抗小鼠 Fas 抗原的纯化仓鼠抗小鼠 Fas 单克隆抗体 (克隆 Jo2, Pharmingen), 该抗体用 80 μ l 磷酸盐缓冲的生理盐水稀释, 使这些小鼠的肝脏变性 (Rodriguez 等, 1996)。用死亡率作为评估肝脏变性的终点。Cbz-Val-Asp-CH₂F 用 Tris 缓冲液配制用于静脉滴注, 并经尾静脉以 1-10mg/kg 的剂量静脉注射给药。10 分钟后, 给动物注射 Fas 抗体。在 30 分钟、1、3 和 24 小时对死亡率计数。对于每种化合物都有只接受 Fas 抗体的对照动物组。对接受最高剂量的那些动物观察它们的急性行为反映 (例如, 镇静、运动活跃性、步态改变、惊厥、straub tail、震颤等), 然后将它们关笼过夜并在第二天检查毒性/死亡率。

在这些实验中, Cbz-Val-Asp-CH₂F 是抗 Fas 诱导的致死率的令

人惊奇的强抑制剂。静脉注射单一的 1mg/kg 剂量就在抗体给药后不超过 1 小时完全保护了小鼠免受抗 Fas 的伤害, 剂量低至 0.25mg/kg 仍产生了近乎 100% 的保护作用。相比之下, 在载体对照组中, 所有的小鼠在这一时间点时都死了。Cbz-Val-Asp-CH₂F 还显示了不超过 24 小时的实质性保护作用 (28% 存活)。独立的研究显示, 对致死率的保护与肝酶 SPGT 和 SGOT 的诱导作用的预计减弱有关。

这些结果证明, Cbz-Val-Asp-CH₂F 在对小鼠肝编程性细胞死亡模型系统给药后在体内是高活性的。

实施例 28

Cbz-Val-Asp-CH₂F 在病灶局部缺血的大鼠模型中的 神经保护作用

(i) 准备性手术: 使用重 200-240g 的雄性 Fischer-344 大鼠 (Harlan Sprague Dawley, CA)。这些动物首先在 30% 氧和 70% 空气的混合物中用 3% 氟烷麻醉。将氟烷浓度减小到 1.5% 用于维持整个手术过程中的麻醉状态。准备性手术包括: (a) 静脉导管植入: 暴露左股静脉, 插入填充有载体的 Teleflex 导管直到下腔静脉, 用于随后的给药。(b) 动脉导管植入: 在股动脉插套管, 用于在局部缺血过程中、开始给药时和动脉再灌注时, 监测血压以及其他生理条件包括 pO₂、pCO₂、pH、葡萄糖、血细胞比容。动脉和静脉导管都通过动物的背部外置, 以便能自由移动。(c) 将 PhysioTel 传递器 (Data Sciences International, MI) 植入腹腔, 以远程监测动物 22 小时的体温。

(ii) 生理学参数: 在手术过程中, 利用 YSI 可再用温度探针 (YSI 有限公司, Yellow Spring, OH) 使核心体温维持 37.5℃, 所述探针与 YSI 温度控制装置 (73A 型, YSI 有限公司, Ohio) 和电热垫 (756 型, Sunbeam-Oster 有限公司, Hattiesburg, MS) 连接。局部缺血后, PhysioTel 传递器被激活, 每 5 分钟记录核心体温。整个手术中, 在药物 (药团) 静脉滴注过程中和局部缺血开始后 1、2、

3 和 4 小时, 监测系统血压。在动脉闭塞和再灌注时, 测定其他生理学条件, 包括 pO_2 、 pCO_2 、pH、葡萄糖和血细胞比容。

(iii) 瞬时病灶局部缺血模型: 准备性手术后, 沿腹侧中线进行颈切口, 以暴露出两个 CCA。右 CCA 用 4-0 号结扎丝线永久结扎, 而左 CCA 用无创伤动脉瘤夹夹紧。垂直于右眼的旁侧眼角和外耳道之间一条线并与其交叉地作一个 1cm 的切口。切开下面的颞肌并牵开, 并使之在解剖显微镜 (SZ-STB1 型, Olympus, 日本) 的帮助下直接观察, 大脑中动脉 (MCA) 通过一个 2mm 钻孔暴露, 该孔向颞弓和颞鳞骨的融合处钻入 2-3mm。钻孔在用生理盐水连续冲洗的条件下进行。切割并拉开硬脑膜以暴露出鼻裂中的 MCA。因 MCA 流过鼻裂, 故用科德曼微动脉瘤夹 (1 号) 暂时闭合 MCA。用解剖显微镜检验血流的中断。用外科手术夹封闭切口, 终止麻醉, 动物苏醒后 (几分钟内) 将它们返回到自己的笼中。经受瞬时局部缺血的大鼠在 MCA 闭合后 2.5 小时后再次麻醉。确认 MCA 闭合后, 将 MCA 和左 CCA 上的夹子除去, 视觉观察证实 MCA 中血流恢复。将切口封闭, 大鼠返回到自己的笼中。让需要短期复原的动物存活 24 小时。所有动物在处死前深度麻醉。将大脑取出, 作 2mm 冠状面的切片并置于 TTC 中。梗塞组织看起来苍白, 可以与相邻的活组织区别开。皮质和皮质下的梗塞面积用图像加工软件盲测, 梗塞体积通过将已知厚度的各测量值合计计算出来。

(iv) 统计分析: 对实验组和对照组中的每一个动物小组的所有生理学参数、温度记录和皮质梗塞体积进行统计学对比。统计学分析利用 Sigmastat 软件 (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA) 进行。未成对数据进行 T 检验, ANOVA 用于多重比较。p 值小于 0.05 被认为是显著的。用 SigmaPlot v 2.01 软件 (Jandel Scientific) 绘制曲线图。

在两个中风研究实验中, 用大鼠 (Fischer-344) 瞬时病灶局部缺血模型检验 Cbz-Val-Asp-CH₂F 的体内神经保护性能。局部缺血发生后 10 分钟, 静脉输注 20mg/kg Cbz-Val-Asp-CH₂F, 接着连续静

脉滴注 5mg/kg/h。在实验 1 中，连续滴注 6 小时。在实验 2 中，滴注延长至 12 小时。

在两个研究中均发现 Cbz-Val-Asp-CH₂F 显著减少了皮质梗塞：实验 1 中为 46% ($p < 0.05$)，实验 2 中为 57% ($p < 0.05$) (图 11A 和 11B)。给药后，血压、血内气体、或温度都没有变化。这些结果证明，Cbz-Val-Asp-CH₂F 在紧急静脉内给药后是良好耐受的，并且它是瞬时病灶脑局部缺血的大鼠模型的强神经保护剂。

现在已对本发明进行了全面描述，本领域普通技术人员将能明了，本发明可在不影响本发明范围或其任何实施方案的广泛而等价的疾病、制剂和其他参数内完成。本文中提及的所有专利和出版物均全文引入作为参考。

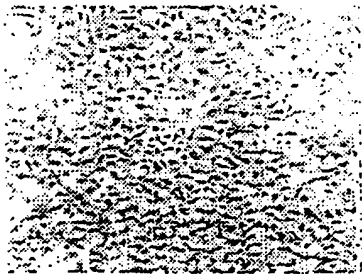


图 1A

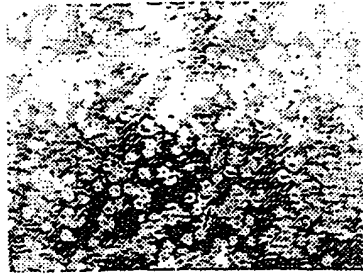


图 1B



图 1C



图 1D

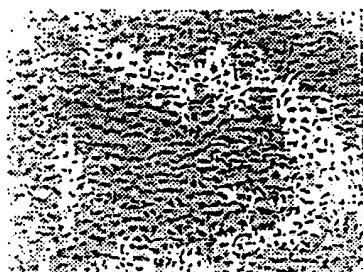


图 1E

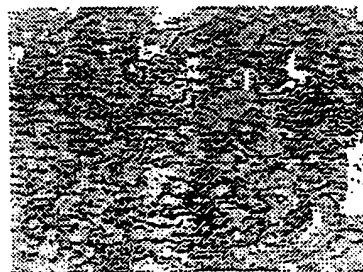


图 1F

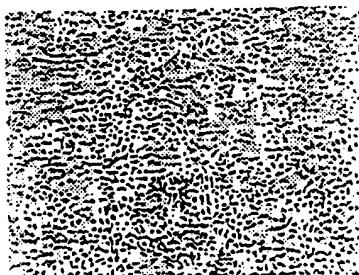


图 1G

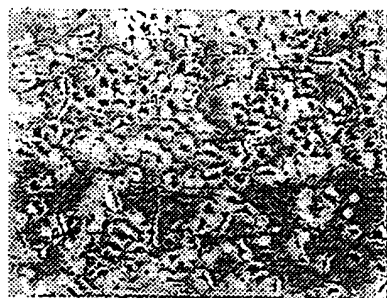


图 2A

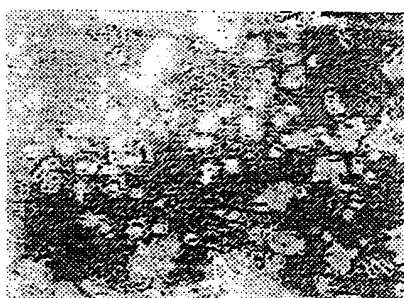


图 2B

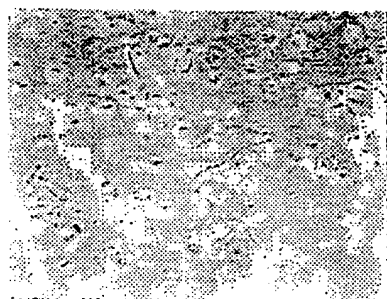


图 2C

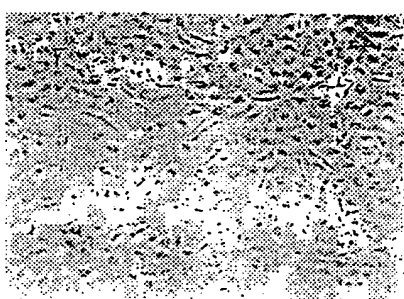


图 2D

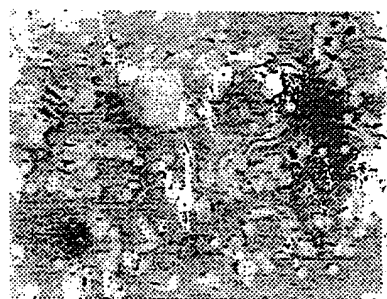


图 2E



图 2F

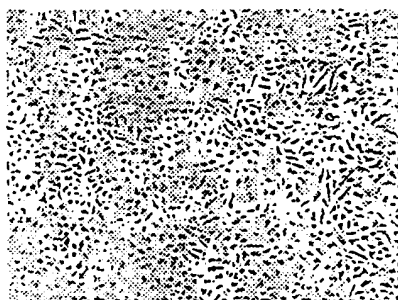


图 2G



图 3A

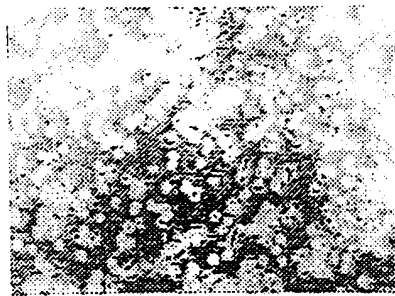


图 3B

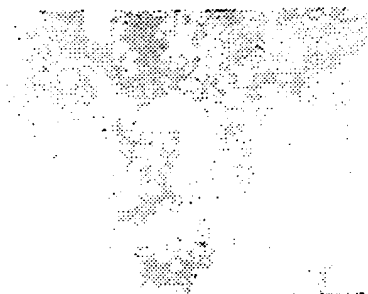


图 3C

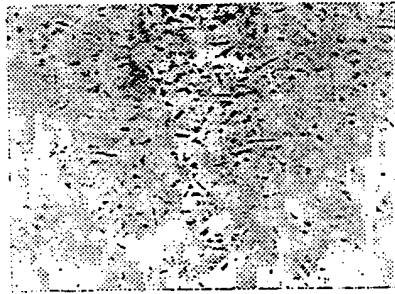


图 3D

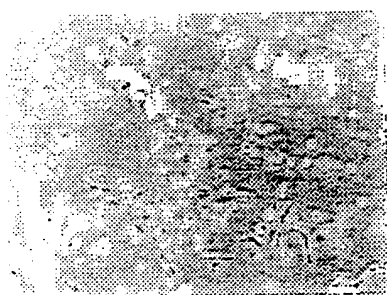


图 3E

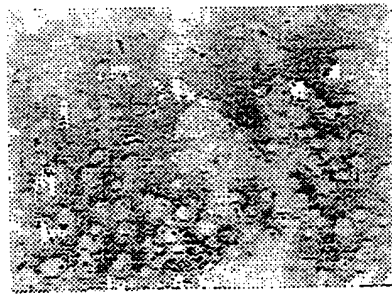


图 3F

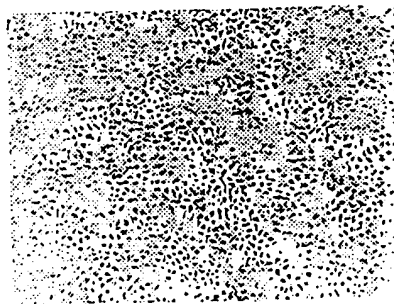


图 3G

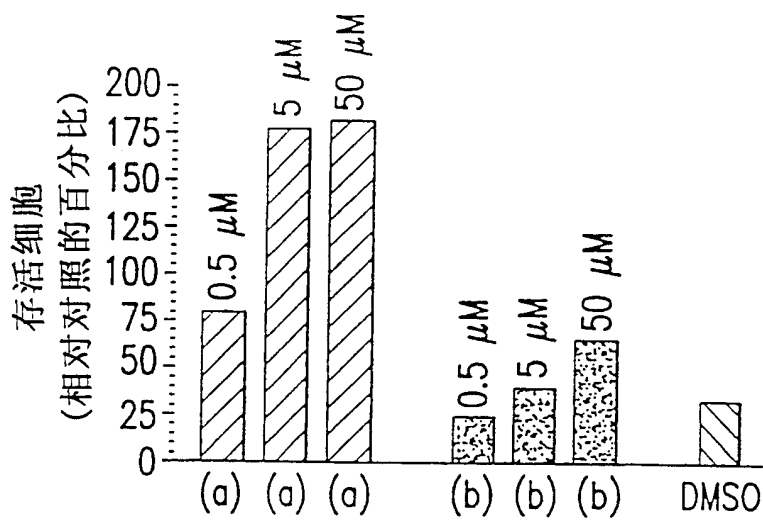


图 4

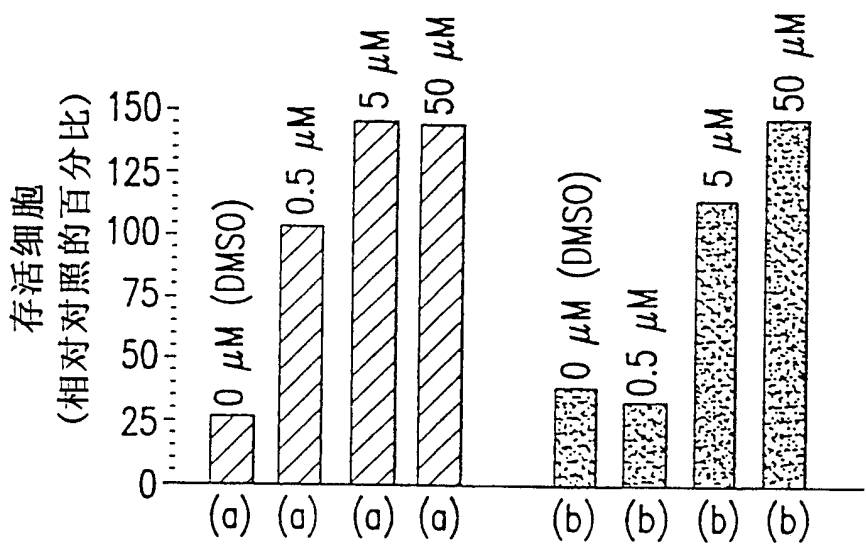


图 5

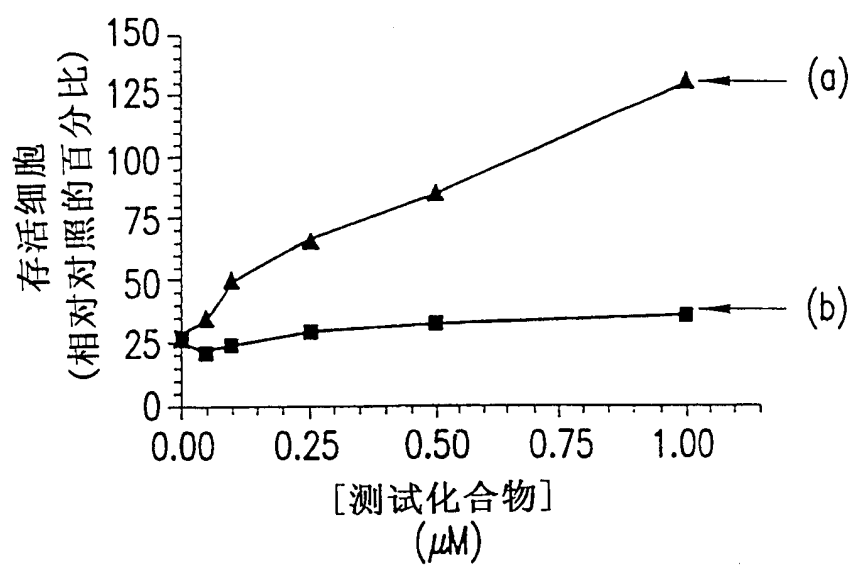


图 6

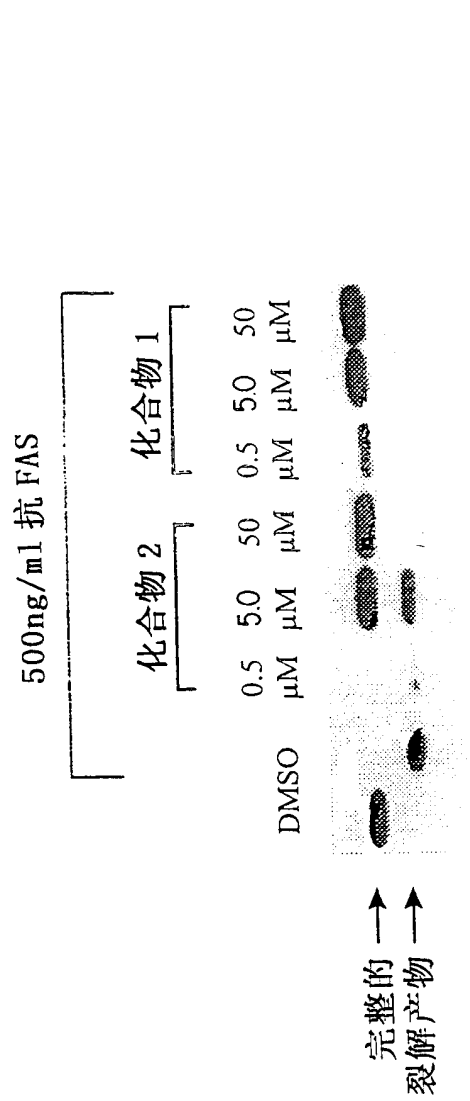


图 7A

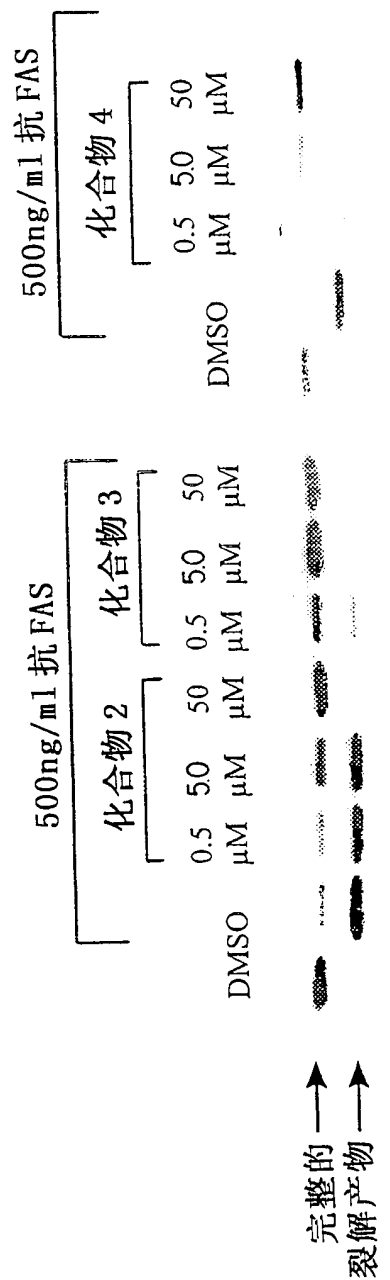


图 7B

图 7C

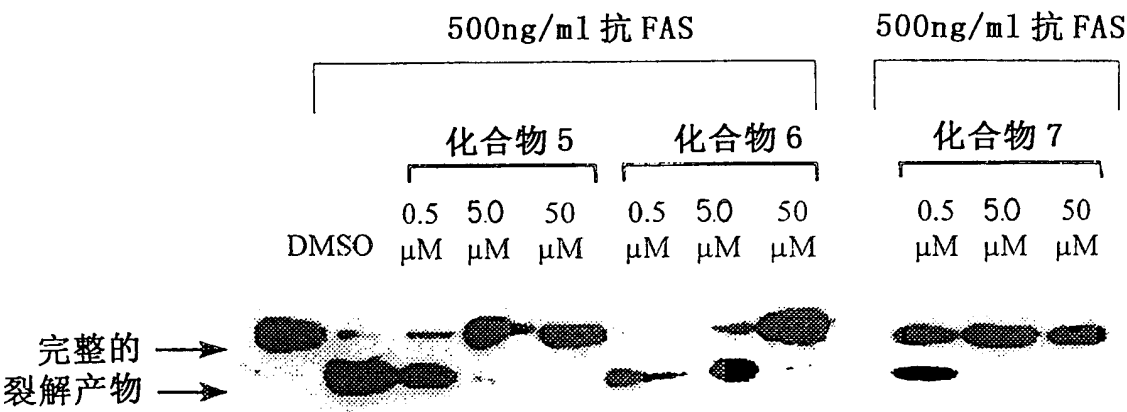


图 7D

图 7E

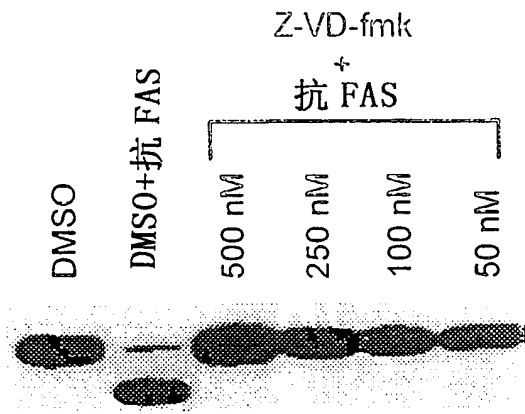


图 8A



图 8B

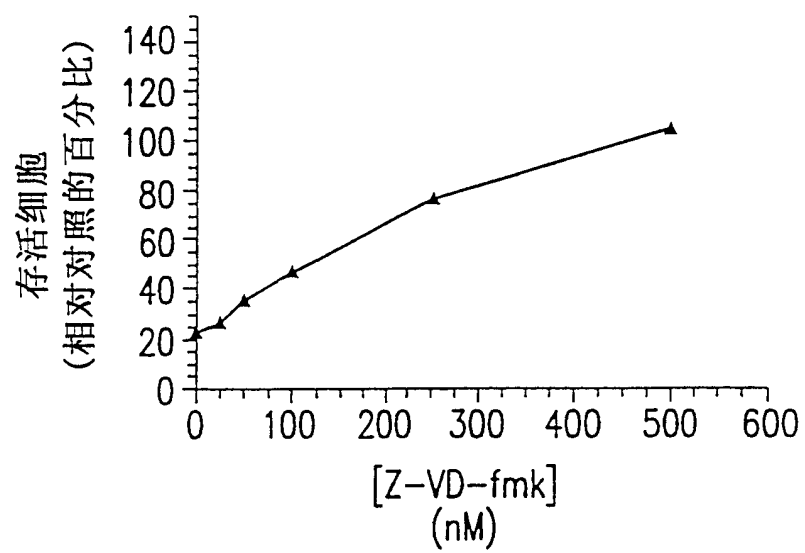


图 9

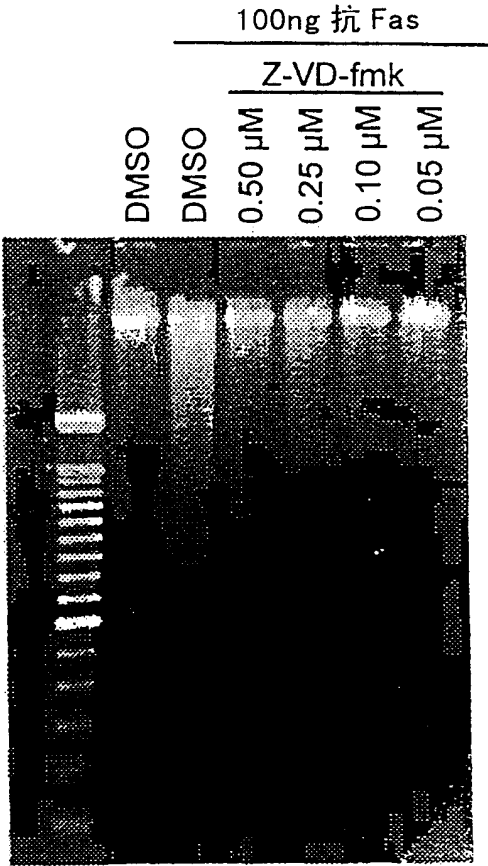


图 10

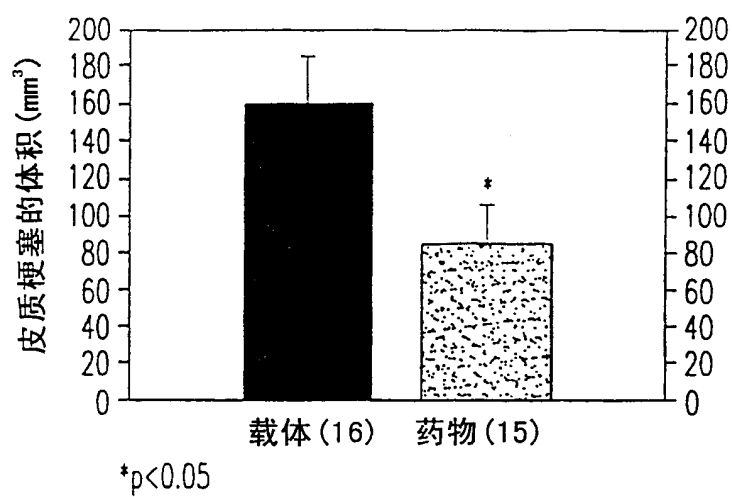


图 11A

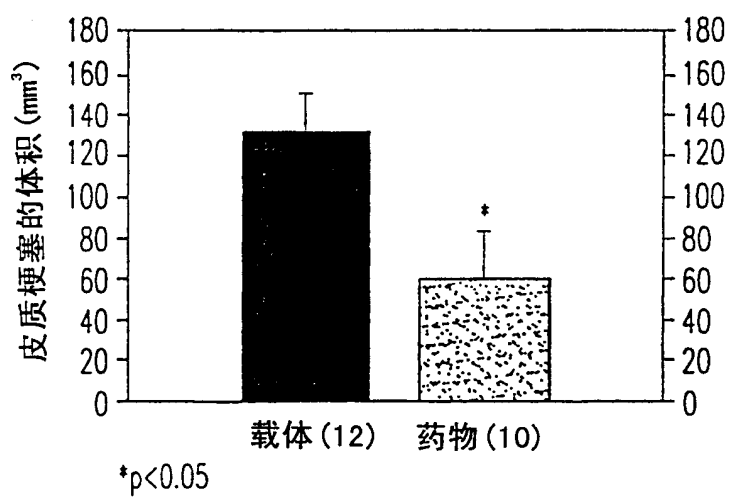


图 11B