

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95192004.9

C07D261/04
A61K 31/42
C07D261/08 C07F 9/653
C07D413/04 C07D413/12
C07D261/20

[45]授权公告日 2000年9月27日

[11]授权公告号 CN 1056836C

[22]申请日 1995.3.3 [24]颁证日 2000.7.14

[21]申请号 95192004.9

[30]优先权

[32]1994.3.10 [33]DE [31]P4408084.0

[86]国际申请 PCT/EP95/00784 1995.3.3

[87]国际公布 WO95/24397 德 1995.9.14

[85]进入国家阶段日期 1996.9.9

[73]专利权人 赫彻斯特股份公司

地址 联邦德国法兰克福

[72]发明人 W·施瓦布 H·安格诺斯托普洛斯

R·R·巴特勒特 R·施莱尔巴赫

K·U·威思曼

[56]参考文献

EP245825 1987.11.19 A61K31/40

EP449223 1991.10.2 A61K31/42

JP58148858 1983.9.5 A61K31/40

审查员 李虹奇

[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

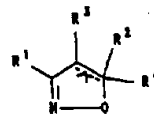
代理人 黄泽雄

权利要求书 11 页 说明书 68 页 附图页数 0 页

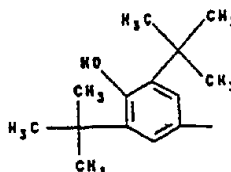
[54]发明名称 3,5-二取代的和3,4,5-三取代2-异噁唑啉和异噁唑,其制备方法及其作为药物的用途

[57]摘要

一种式(I)的化合物,式(I)的化合物的生理耐受盐和/或式(I)的化合物的立体异构形式,其中残基R¹或R²如式(II)所示,适于制备用于治疗炎症,气喘,风湿病和自身免疫疾病的药物。



(I)

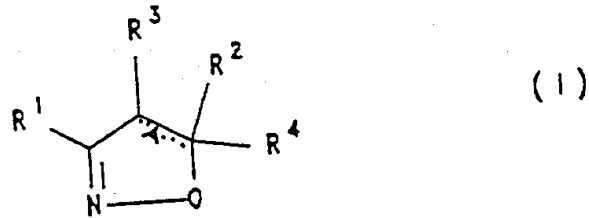


(II)

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

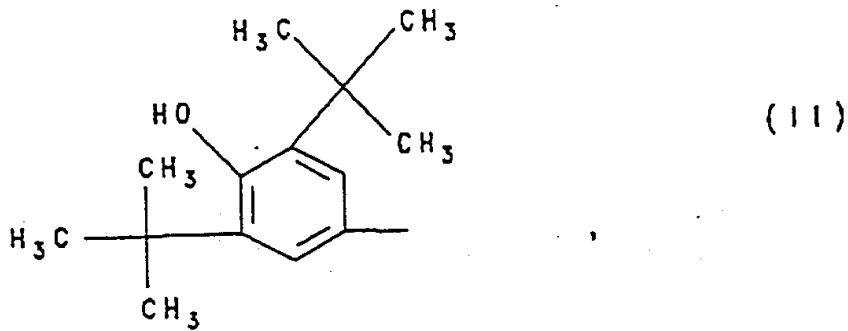
1. 一种式 I 化合物



和/或式 I 化合物的生理耐受盐

和/或式 I 化合物的立体异构形式;

在这里, 基团 R¹ 或 R² 之一具有式 II 的意义



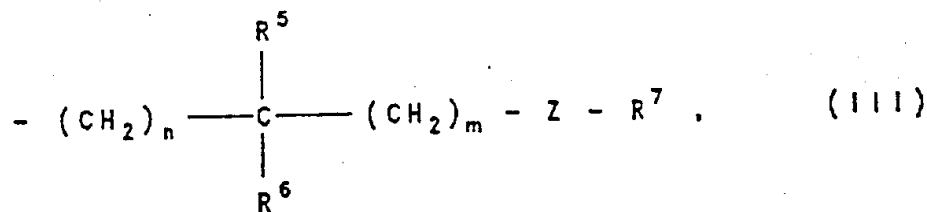
而基团 R¹ 或 R² 的另一个具有如下意义:

a) 吡啶基,

b) 噻吩基,

c) 噻唑基,

d) 式 III 的基团



其中 n 是数字 0, 1, 2, 3, 4, 5 或 6,

m 是数字 0, 1, 2, 3 或 4,

z 是 1) - O -, 或

2) - NH -,

R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为

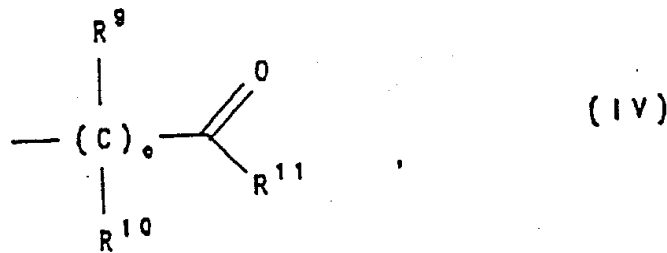
- 1) 氢原子,
- 2) (C₁ - C₄) 烷基,
- 3) (C₂ - C₄) 烯基,
- 4) (C₂ - C₄) 炔基,
- 5) 苯基, 或
- 6) OH, 和

R⁷ 为 1) 氢原子,

- 2) 氨基酸残基,
- 3) 三氟甲磺酰基,
- 4) - O - P (O) (OH)₂,
- 5) 用苯基或 (C₁ - C₆) 烷基——或二——酯化的 - O - P

(O) (OH)₂, 或

6) 式 IV 的基团

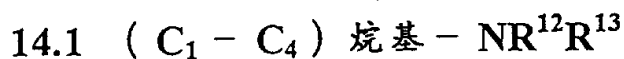


其中 0 是数字 0 或 1, 且其中 R⁹ 和 R¹⁰ 各自独立地具有如下意义:

- 1) 氢原子, 或
 - 2) (C₁ - C₄) 烷基, 和
- R¹¹ 为
- 1) OH,
 - 2) - O - (C₁ - C₄) 烷基,
 - 3) (C₁ - C₂₀) 烷基,
 - 4) (C₁ - C₂₀) 烷基, 各自独立地被
 - 4.1 - COOH,
 - 4.2 - OH,
 - 4.3 O - 乙酰基, 或
 - 4.4 = O

一次或多次取代,

- 5) $-\text{COOH}$,
- 6) $-\text{COO} - (\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基 - ,
- 7) N - 甘氨酸基,
- 8) N - 甘氨酸基 - $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基酯,
- 9) N - $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ - 烷基羟基氨基,
- 10) N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 氨基,
- 11) 5 - 甲基异噁唑 - 4 - 基,
- 12) 1 - 氨基 - 2 - 羟基 - 1 - 丙烯基,
- 13) 苯基,
- 14) 被下式基团一次或多次取代的苯基,



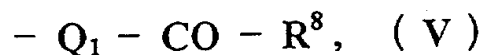
其中 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地具有如下意义:

- 1) 氢原子,
- 2) $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基,
- 3) 苯基 - $(\text{C}_1 - \text{C}_2)$ - 烷基,
- 4) R^{12} 和 R^{13} 与连接它们的氮原子一起形成五 - 至七 - 员杂环, 该杂环是未取代的或被 $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基取代一至三次, 该取代基的一个碳原子可被硫, 氧或氮原子代替, 或

5) 氨基酸残基, 或

R^6 和 R^7 互相键连, 并一起为 1 至 3 个 CH_2 基团,

e) 式 V 的基团



其中 Q_1 是

- 1) $-(\text{CH}_2)_m -$, 其中 m 是数字 0, 1, 2, 3 或 4, 或
- 2) $-\text{CH} = \text{CH} -$, 和

R^8 是 1) 氢原子,

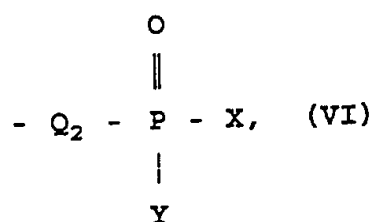
- 2) $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基,
- 3) OH ,
- 4) $-\text{O} - (\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基 -

5) NH_2 ,

6) $\text{N} - (1\text{H} - \text{四唑} - 5 - \text{基})$ 氨基, 或

7) $\text{N} - (3, 5 - \text{二甲基} - 4 - \text{羟基苄基})$ 氨基, 或

f) 式 VI 的基团



其中 Q_2 是

1) $-(\text{CH}_2)_m$, 其中 m 是数字 0, 1, 2, 3 或 4, 或

2) $-\text{CH}=\text{CH}-$, 和

X 和 Y 各自独立地为

1) $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基,

2) $-\text{O} - (\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基, 或

3) OH ,

$\dots \text{A} \dots$ 是存在或不存在的双键, 其限制是双键和基团 R^4 不同时存在,

R^4 是 1) 氢原子, 或

2) $(\text{C}_1 - \text{C}_6)$ - 烷基, 或

R^2 和 R^4 与连接它们的碳原子一起形成由 3, 4 或 5 个碳原子组成的脂族环, 而

R^3 是 1) 氢原子,

2) $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基, 或

3) 羟基 - $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基。

2. 根据权利要求 1 的式 I 化合物, 其中基团 R^1 或 R^2 之一具有式 II 的意义,

而基团 R^1 或 R^2 的另一个具有如下意义:

a) 2 - 吡啶基,

b) 4 - 吡啶基,

- c) 噻吩-3-基,
- d) 2-噻唑基,
- e) 式 III 的基团,

其中 n 是数字 0,1,2,3 或 4, 而 m 是数字 0 或 1,

- z 是
- 1) -O-, 或
 - 2) -NH-, 或

R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为

- 1) 氢原子,
- 2) (C₁ - C₂) 烷基,
- 3) 苯基, 或
- 4) OH, 或

R⁶ 和 R⁷ 互相连接一起形成亚甲基, 或

- R⁷ 为
- 1) 氢原子,
 - 2) 三氟甲磺酰基,
 - 3) 氨基酸基 Gly, Phe, Ala, Lys, Tyr 或 Ser, 或
 - 4) 式 IV 的基团

其中 O 为数字 0 或 1,

R⁹ 和 R¹⁰ 各自独立地为

- 1) 氢原子, 或
- 2) 甲基,

R¹¹ 是:

- 1) OH,
- 2) -O-(C₁ - C₄) 烷基,
- 3) (C₁ - C₁₈) 烷基,
- 4) 互相独立地被下列基团取代一次或多次的 (C₁ - C₆) 烷基,
 - 4.1 -COOH,
 - 4.2 OH, 或
 - 4.3 O-乙酰基,
- 5) -COOH,

- 6) -COO-(C₁-C₄)-烷基,
- 7) N-甘氨酸基,
- 8) N-甘氨酸基-(C₁-C₄)烷基酯,
- 9) N-甲基羟基氨基,
- 10) N-(1H-四唑-5-基)氨基,
- 11) 5-甲基异噁唑-4-基, 或
- 12) 1-氨基-2-羟基-1-丙烯基,
- 13) 苯基, 被

13.1) 4-(4-吗啉代)甲基取代一次

f) 式 V 的基团

其中 Q₁ 是

- 1) -(CH₂)_m-, 其中 m 是数字 0, 1, 或 2, 或
- 2) -CH=CH-, 而

R⁸ 是

- 1) 氢原子,
- 2) 甲基,
- 3) OH
- 4) -O-(C₁-C₂)烷基,
- 5) 氨基,
- 6) N-(1H-四唑-5-基)氨基, 或
- 7) N-3, 5-二甲基-4-羟基苄基, 或

g) 式 VI 的基团,

其中 Q₂ 是

- 1) -(CH₂)_m-, 其中 m 是数字 0, 1 或 2, 或
- 2) -CH=CH-,

X 和 Y 互相独立地为

- 1) 甲基,
- 2) -O-(C₁-C₂)-烷基, 或
- 3) OH,

... A ... 是存在或不存在的双键, 其限制是双键和 R⁴ 基团不能同时

存在,

R^4 为 1) 氢原子, 或

2) $(C_1 - C_2)$ - 烷基, 或

R^2 和 R^4 与它们所连接的碳原子一起形成具有 3, 4, 或 5 个碳原子的脂环,

R^3 是 1) 氢原子, 或

2) 甲基, 或

3) 羟甲基。

3. 根据权利要求 1 或 2 的式 I 化合物, 其中基团 R^1 或 R^2 之一具有式 II 的意义

而基团 R^1 或 R^2 的另一个具有如下意义:

a) 2-吡啶基,

b) 4-吡啶基,

c) 噻吩-3-基,

d) 2-噻唑基,

e) 式 III 的基团,

其中 n 是数字 0, 1, 2, 3 或 4, 而 m 是数字 0 或 1,

z 是 1) - O -, 或

2) - NH -, 或

R^5 和 R^6 各自独立地为

1) 氢原子,

2) $(C_1 - C_2)$ 烷基,

3) 苯基, 或

R^6 和 R^7 互相连接, 一起形成亚甲基, 或

R^7 为

1) 氢原子,

2) 三氟甲磺酰基,

3) 氨基酸基 Gly, Lys 或 Phe, 或

4) 式 IV 的基团

其中 O 为数字 0 或 1,

R^9 和 R^{10} 各自独立地为

- 1) 氢原子, 或
- 2) 甲基,

R^{11} 是:

- 1) OH,
- 2) O - 甲基或 O - 乙基,
- 3) ($C_1 - C_{18}$) 烷基,
- 4) 互相独立地被下列基团取代一次或多次的 ($C_1 - C_6$) 烷

基,

- 4.1 - COOH,
- 4.2 OH, 或
- 4.3 O - 乙酰基,
- 5) - COOH,
- 6) - COO - ($C_1 - C_2$) - 烷基,
- 7) N - 甘氨酸基,
- 8) N - 甘氨酸基 - ($C_1 - C_2$) 烷基酯,
- 9) N - 甲基羟基氨基,
- 10) N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 氨基,
- 11) 5 - 甲基异噁唑 - 4 - 基, 或
- 12) 1 - 氨基 - 2 - 羟基 - 1 - 丙烯基,

f) 式 V 的基团,

其中 Q_1 是

- 1) - (CH_2) $_m$ -, 其中 m 是数字 0, 1, 或 2, 或
- 2) - CH = CH -, 而

R^8 是

- 1) 氢原子,
- 2) 甲基,
- 3) OH
- 4) - O - 甲基,
- 5) 氨基,

6) N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 氨基, 或

7) N - 3, 5 - 二甲基 - 4 - 羟基苄基, 或

g) 式 VI 的基团,

其中 Q_2 是

1) $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是数字 0, 或

2) $-CH=CH-$,

X 和 Y 互相独立地为

1) 甲基,

2) $-O-(C_1-C_2)-$ 烷基, 或

3) OH,

... A ... 是存在或不存在的双键, 其限制是双键和 R^4 基团不能同时存在,

R^4 为

1) 氢原子, 或

2) 甲基, 或

R^2 和 R^4 与它们所连接的碳原子一起形成具有 3, 4, 或 5 个碳原子的脂环,

R^3 是

1) 氢原子, 或

2) 羟甲基。

4. 一种制备式 I 的 2 - 异噁唑啉和异噁唑、和/或式 I 化合物的立体异构形式、和/或式 I 化合物的生理耐受盐的方法, 其中

a) 用异氰酸酯和催化量的三乙胺将伯硝基化合物转化为对应的脒氧化物, 或用有机或无机碱将通过氯化对应的醛肟得到的异羟肟酰氯转化为对应的脒氧化物, 作为中间体得到的该脒氧化物不经纯化就与适当取代的烯或炔反应, 进行 1, 3 - 二极环加成, 形成式 I 的 2 - 异噁唑啉或异噁唑, 如果需要, 生成的产物通过结晶或色谱纯化, 或

b) 根据 a) 或 o) 制备的式 I 的羧酸酯, 或通过方法 h) 或 k) 额外引入的酯基, 被水解为羧酸, 或

c) 根据方法 a) 或 o) 制备的式 I 的羧酸烷基酯用适当取代的伯胺或仲胺转化为对应的酰胺, 或

- d) 根据 a) 或 o) 制备的式 I 的次膦酸一烷基酯或膦酸二烷基酯被水解为膦酸半酯, 膦酸或次膦酸, 或
- e) 根据 b) 得到的羧酸首先被转化为活化的酸衍生物, 此衍生物随后用醇酯化, 或用伯胺或仲胺转化为对应的酰胺, 或用 N-烷基化的羟胺转化为对应的羟基酰胺, 或
- f) 在方法 a), b), h), e), o) 或 g) 在中中间得到的或携带的 N-保护基或 O-保护基被消除, 或被引入的羧酸, 次膦酸, 膦酸或磷酸酯被相应水解, 得到式 I 化合物, 或
- g) 根据方法 f) 或 o) 得到的, 并具有游离氨基的化合物通过与异氰酸酯反应, 转化为相应的脲衍生物, 或通过与活化的羧酸衍生物或 N-保护的氨基酸反应, 转化为相应的酰胺, 或通过与磺酰氯反应, 转化为对应的磺酰胺, 或
- h) 根据方法 a), o) 或 f) 得到的, 具有游离醇基的化合物通过与异氰酸酯反应, 转化为相应的脲烷, 或通过与在羧基上被活化并可进一步带有官能团的羧酸衍生物或相应的 N-保护的氨基酸衍生物反应, 转化为相应的酯, 或用二烯酮转化为相应的 3-氧代丁酸酯, 或通过与卤代化合物如 α -卤代羧酸反应, 转化为相应的醚, 或
- i) 根据方法 a), o) 或 f) 得到的, 具有伯或仲醇基的化合物被氧化为相应的醛或酮, 或
- k) 根据方法 i) 制备的羰基化合物通过与碱和二烷基膦酰基乙酸酯反应, 转化为巴豆酸衍生物, 或通过与四烷基亚甲基二膦酸酯反应, 转化为相应的反式-2-(二烷氧基膦酰基) 乙烯基衍生物, 或
- l) 在环加成期间引入的环氧基被转化为相应的 1, 2-二醇, 或
- m) 根据方法 g) 制备的, 含有 3H-异噁唑环的酰胺通过用碱处理进行开环, 转化为 2-氨基-3-羟基巴豆酰胺, 或
- n) 根据方法 a) - m) 制备的, 由于其化学结构而以对映体形式存在的化合物通过与对映体纯的酸或碱成盐, 在手性固定相上层析, 或用手性对映体纯的化合物如氨基酸衍生, 分开这样得到的非对映体, 消除手性辅助基, 被拆分为纯对映体, 或
- o) 通过与手性或外消旋烯环加成得到的式 I 的 2-异噁唑啉非对映异构

体的混合物通过硅胶柱色谱被拆分为纯的非对映异构体，或

p)根据方法 a) - 0)制备的化合物可以以游离形式被分离，或当有酸或碱基存在时，如果需要，被转化为生理耐受盐，或

q)根据方法 h)制备的，带有其它官能团如卤代甲基的化合物被用伯或仲氨基烷基化，或用醇酯化。

5. 一种药物，含有有效量的至少一种如权利要求 1, 2 或 3 的或如权利要求 4 得到的式 I 化合物，和/或式 I 化合物的生理耐受盐和/或式 I 化合物的立体异构形式，加上生理上可接受的辅助物质和载体物质。

6. 至少一种如权利要求 1, 2 或 3 的化合物在制备用于预防和治疗气喘病，炎症和/或自身免疫疾病的药物方面的用途。

说明书

3, 5-二取代的和 3, 4, 5-三取代的 2-异噁唑啉和异噁唑, 其制备方法及其作为药物的用途

本发明涉及用于预防和/或治疗炎症, 气喘, 风湿性疾病和自身免疫疾病的药物。

非留醇类抗炎药物, 例如乙酰基水杨酸和吲哚复辛的作用模式是已知的。其基础是抑制环氧化酶, 该酶存在于许多细胞内, 它产生促进炎症的前列腺素。

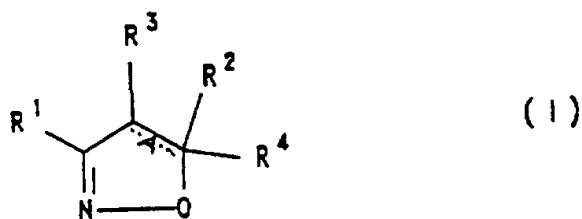
还已知此类环氧化酶抑制剂可被用于风湿病治疗 (EP245825)。

然而, 同时也很清楚, 除了其讨厌的作用外, 前列腺素也可产生需要的细胞保护性质, 例如在血小板中, 在胃十二指肠和肾脏中。因为这一原因, 所有环氧化酶抑制剂都带来讨厌的副作用, 如延长出血时间, 产生胃溃疡和抑制肾功能。

鉴于此, 可以有利地不抑制前列腺素, 而通过封锁其形成来抑制特别有力的炎症介质, 白细胞三烯和细胞因子, 如白细胞介素 1α 和白细胞介素 1β , 氧基和蛋白酶的类别。

现已发现, 式 I 化合物基本上不抑制环氧化酶, 而抑制来自白血细胞的白细胞三烯, 细胞因子, 氧基和蛋白酶, 也证明在试验气喘, 自身免疫疾病和风湿性疾病模型中的正效果。

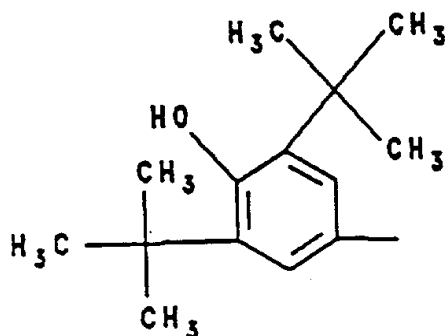
本发明涉及式 I 化合物



和/或式 I 化合物的药理耐受盐

和/或式 I 化合物的立体异构形式;

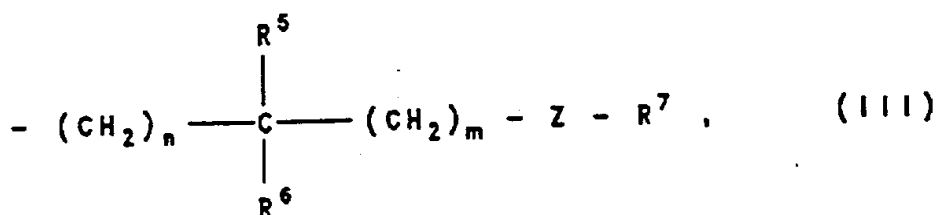
在此文本中, 基团 R^1 或 R^2 中的一个具有式 II 的意义



(II)

而基团 R^1 或 R^2 中的另一个具有如下意义:

- a) 吡啶基,
- b) 噻吩基,
- c) 噻唑基,
- d) 式 III 的基团



其中 n 是数字 0, 1, 2, 3, 4, 5 或 6,

m 是数字 0, 1, 2, 3 或 4,

z 是 1) $-\text{O}-$, 或

2) $-\text{NH}-$,

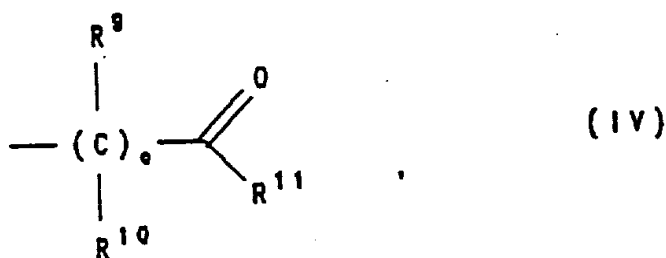
R^5 和 R^6 各自独立地为

- 1) 氢原子,
- 2) $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基,
- 3) $(\text{C}_2 - \text{C}_4)$ 烯基,
- 4) $(\text{C}_2 - \text{C}_4)$ 炔基,
- 5) 苯基, 或
- 6) OH , 和

R^7 为 1) 氢原子,

- 2) 氨基酸残基,
- 3) 三氟甲磺酰基,

- 4) $-O-P(O)(OH)_2$,
 5) 用苯基或 $(C_1 - C_6)$ 烷基——或二——酯化的 $-O-P(O)(OH)_2$, 或
 6) 式 IV 的基团

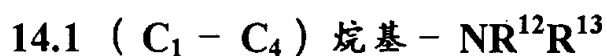


其中 O 是数字 0 或 1, 且其中 R^9 和 R^{10} 各自独立地有如下意义:

- 1) 氢原子, 或
- 2) $(C_1 - C_4)$ 烷基, 和 R^{11} 为
 - 1) OH,
 - 2) $-O-(C_1 - C_4)$ 烷基,
 - 3) $(C_1 - C_{20})$ 烷基,
 - 4) $(C_1 - C_{20})$ 烷基, 各自独立地被
 - 4.1 $-COOH$,
 - 4.2 $-OH$,
 - 4.3 O-乙酰基, 或
 - 4.4 $=O$
 一次或多次取代,
- 5) $-COOH$,
- 6) $-COO-(C_1 - C_4)$ 烷基-
- 7) N-甘氨酸基,
- 8) N-甘氨酸基- $(C_1 - C_4)$ 烷基酯,
- 9) N- $(C_1 - C_4)$ -烷基羟基氨基,
- 10) N- $(1H-四唑-5-基)$ 氨基,
- 11) 5-甲基异噁唑-4-基,
- 12) 1-氨基-2-羟基-1-丙烯基,

13) 苯基,

14) 苯基, 被下式基团一次或多次取代



其中 R^{12} 和 R^{13} 各自独立地具有如下意义:

1) 氢原子,

2) $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基,

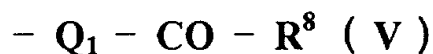
3) 苯基 - $(\text{C}_1 - \text{C}_2)$ - 烷基,

4) R^{12} 和 R^{13} 与连接它们的氮原子一起形成五-至七-员杂环, 该杂环是未取代的或被 $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基取代一至三次, 该取代基的一个碳原子可被硫, 氧或氮原子代替, 或

5) 氨基酸残基, 或

R^6 和 R^7 互相键连, 并一起为 1 至 3 个 CH_2 基团,

e) 式 V 的基团



其中 Q_1 是

1) $-(\text{CH}_2)_m-$, 其中 m 是数字 0, 1, 2, 3 或 4, 或

2) $-\text{CH}=\text{CH}-$, 和

R^8 是 1) 氢原子,

2) $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基,

3) OH ,

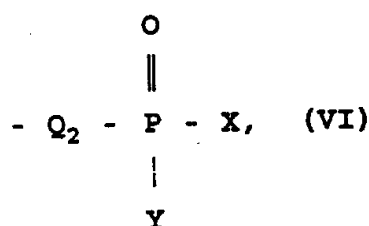
4) $-\text{O}-$ $(\text{C}_1 - \text{C}_4)$ 烷基 -

5) NH_2 ,

6) $\text{N}-(1\text{H}-\text{四唑}-5\text{-基})$ 氨基, 或

7) $\text{N}-(3, 5\text{-二甲基}-4\text{-羟基苄基})$ 氨基, 或

f) 式 VI 的基团



其中 Q_2 是

- 1) $-(CH_2)_m-$ 其中 m 是数字 0, 1, 2, 3 或 4, 或
- 2) $-CH=CH-$, 和

X 和 Y 各自独立地为

- 1) $(C_1 - C_4)$ 烷基,
- 2) $-O-(C_1 - C_4)$ 烷基, 或
- 3) OH,

… A … 是存在或不存在的双键, 其限制是双键和基团 R^4 不同时存在,

R^4 是 1) 氢原子, 或

- 2) $(C_1 - C_6)$ - 烷基, 或

R^2 和 R^4 与连接它们的碳原子一起形成由 3, 4 或 5 个碳原子组成的脂族环, 而

R^3 是 1) 氢原子

- 2) 羟基 - $(C_1 - C_4)$ 烷基, 或
- 3) 羟基 - $(C_1 - C_4)$ 烷基。

式 I 化合物可以光学异构体, 非对映异构体或外消旋体, 或其混合物存在于药物中。设计的烷基或烷酰基可以直链或支链的形式存在。

对本发明来说, 五-至七-原杂环是, 例如, 吡咯, 吡啶, 氮杂草, 噻唑, 异噻唑, 噁唑, 异噁唑, 吡唑, 咪唑, 噻吩, 1, 2-噁吩, 1, 3-噁吩, 吗啉, 哒嗪, 嘧啶, 吡嗪, 1, 2-硫氮杂草, 1, 3-硫氮杂草, 1, 4-硫氮杂草, 1, 2-氧氮杂草, 1, 3-氧氮杂草, 1, 4-氧氮杂草, 1, 2-二氮杂草, 1, 3-二氮杂草, 1, 4-二氮杂草或其部分或完全饱和的变体。特别应提到吡咯烷, 哌啶, 吗啉, 哌嗪, N-甲基哌嗪或吡啶。

术语“氨基酸”被理解为立体异构形式, 例如如下化合物的 D 和 L 形式:

天冬酰胺, 缬氨酸, 精氨酸, 天冬氨酸, 谷氨酰胺, 谷氨酸, 色氨酸, β -丙氨酸, 赖氨酸, 脯氨酸, 甘氨酸, γ -氨基丁酸, N ϵ -乙酰基赖氨酸, N δ -鸟氨酸, N γ -乙酰基二氨基丁酸, N α -乙酰基二氨基丁酸, 组氨酸, 异亮氨酸, 亮氨酸, 苯丙氨酸, 丝氨酸, 半胱氨酸,

苏氨酸，丙氨酸和酪氨酸。L-氨基酸是优选的。氨基酸残基从相应的氨基酸衍生。氨基酸的名称以习惯方式缩写。氨基酸残基通过酰胺键连接到 -NH- 上或通过酯键连接到 -O- 上。

下列氨基酸残基是优选的：

Gly, Ala, Phe, Ser, Thr, Val, β -Ala, γ -氨基丁酸, Asp, Glu, Gln, N ϵ -乙酰基赖氨酸, N δ -乙酰基鸟氨酸, N α -乙酰基二氨基丁酸, Lys 或 tyr。

优选的式 I 化合物和/或式 I 化合物的药理耐受盐和/或式 I 化合物的立体异构形式，其中 R¹ 或 R² 中的一个具有式 II 的意义，而 R¹ 或 R² 中的另一个具有如下意义：

- a) 2-吡啶基，
- b) 4-吡啶基，
- c) 噻吩-3-基，
- d) 2-噻唑基，
- e) 式 III 的基团，

其中 n 是数字 0, 1, 2, 3 或 4, 而 m 是数字 0 或 1,

z 是 1) -O-, 或

2) -N-, 或

R⁵ 和 R⁶ 各自独立地为

- 1) 氢原子，
- 2) (C₁ - C₂) 烷基，
- 3) 苯基，或
- 4) OH, 或

R⁶ 和 R⁷ 互相连接一起形成亚甲基，或

R⁷ 为 1) 氢原子，

- 2) 三氟甲磺酰基，
- 3) 氨基酸基 Gly, Phe, Ala, Lys, Tyr, 或 Ser, 或
- 4) 式 IV 的基团

其中 O 为数字 0 或 1,

R⁹ 和 R¹⁰ 各自独立地为

1) 氢原子, 或

2) 甲基,

R^{11} 是:

1) OH,

2) $-O-(C_1-C_4)$ - 烷基,

3) (C_1-C_{18}) 烷基,

4) 互相独立地被下列基团取代一次或多次,

4.1 $-COOH$,

4.2 OH, 或

4.3 O - 乙酰基,

5) $-COOH$,

6) $-COO-(C_1-C_4)$ - 烷基,

7) N - 甘氨酸基,

8) N - 甘氨酸基 - (C_1-C_4) 烷基酯,

9) N - 甲基羟基氨基,

10) N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 氨基,

11) 5 - 甲基异噁唑 - 4 - 基,

12) 1 - 氟基 - 2 - 羟基 - 1 - 丙烯基,

13) 被 13.1 4 - (4 - 吗啉代) 甲基取代一次的苯基,

f) 式 V 的基团,

其中 Q_1 是

1) $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是数字 0, 1, 或 2, 或

2) $-CH=CH-$, 而

R^8 是 1) 氢原子,

2) 甲基,

3) OH

4) $-O-(C_1-C_2)$ - 烷基,

5) 氨基,

6) N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 氨基, 或

7) N - 3, 5 - 二甲基 - 4 - 羟基苄基, 或

g) 式 VI 的基团,

其中 Q_2 是

1) $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是数字 0, 1, 或 2, 或

2) $-CH=CH-$,

X 和 Y 互相独立地为

1) 甲基,

2) $-O-(C_1-C_2)-$ 烷基, 或

3) OH,

… A … 是存在或不存在的双键, 其限制是双键和 R^4 基团不能同时存在,

R^4 为

1) 氢原子, 或

2) $(C_1-C_2)-$ 烷基, 或

R^2 和 R^4 与它们所连接的碳原子一起形成具有 3, 4 或 5 个碳原子的脂环,

R^3 为

1) 氢原子,

2) 甲基, 或

3) 羟甲基。

特别优选的是式 I 化合物和/或式 I 化合物的生理耐受盐和/或式 I 化合物的立体异构形式, 其中基团 R^1 或 R^2 之一具有式 II 的意义, 而 R^1 或 R^2 中的另一个具有如下意义:

a) 2-吡啶基,

b) 4-吡啶基,

c) 噻吩-3-基,

d) 2-噻唑基,

e) 式 III 的基团,

其中 n 是数字 0, 1, 2, 3 或 4, 而 m 是数字 0 或 1,

z 是 1) $-O-$, 或

2) $-NH-$, 或

R^5 和 R^6 各自独立地为

- 1) 氢原子,
- 2) ($C_1 - C_2$) 烷基,
- 3) 苯基, 或

R^6 和 R^7 互相连接一起形成亚甲基, 或

- R^7 为
- 1) 氢原子,
 - 2) 三氟甲磺酰基,
 - 3) 氨基酸基 Gly, Lys, 或 Phe, 或
 - 4) 式 IV 的基团

其中 O 为数字 0 或 1,

R^9 和 R^{10} 各自独立地为

- 1) 氢原子, 或
- 2) 甲基,

R^{11} 是:

- 1) OH,
- 2) - O - 甲基或 O - 乙基,
- 3) ($C_1 - C_{18}$) 烷基,
- 4) 互相独立地被下列基团取代一次或多次的
($C_1 - C_6$) 烷基,
 - 4.1 - COOH,
 - 4.2 OH, 或
 - 4.3 O - 乙酰基,
- 5) - COOH,
- 6) - COO - ($C_1 - C_2$) - 烷基,
- 7) N - 甘氨酸基,
- 8) N - 甘氨酸基 - ($C_1 - C_2$) 烷基酯,
- 9) N - 甲基羟基氨基,
- 10) N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 氨基,
- 11) 5 - 甲基异恶唑 - 4 - 基, 或
- 12) 1 - 氨基 - 2 - 羟基 - 1 - 丙烯基,

f) 式 V 的基团,

其中 Q_1 是

- 1) $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是数字 0, 1, 或 2, 或
- 2) $-CH=CH-$, 而

R^8 是

- 1) 氢原子,
- 2) 甲基,
- 3) OH
- 4) $-O-$ 甲基,
- 5) 氨基,
- 6) $N-(1H-四唑-5-基)$ 氨基, 或
- 7) $N-3, 5-二甲基-4-羟基苄基$, 或

g) 式 VI 的基团,

其中 Q_2 是

- 1) $-(CH_2)_m-$, 其中 m 是数字 0, 或 2, 或
- 2) $-CH=CH-$

X 和 Y 互相独立地为

- 1) 甲基
- 2) $-O-(C_1-C_2)-$ 烷基, 或
- 3) OH,

… A … 是存在或不存在的双键, 其限制是双键和 R^4 基团不能同时存在,

R^4 为 1) 氢原子, 或

2) 甲基, 或

R^2 和 R^4 与它们所连接的碳原子一起形成具有 3, 4, 或 5 个碳原子的脂环,

R^3 是 1) 氢原子, 或

2) 羟甲基。

以结构式列于表 1 的化合物是非常优选的。

本发明也涉及制备式 I 的 2-异噁唑啉或异噁唑和/或式 I 化合

物的立体异构形式和/或式 I 化合物的生理耐受盐的方法，其中

a) 用异氰酸酯和催化量的三乙胺将伯硝基化合物转化为对应的脒氧化物，或用有机或无机碱将通过氯化对应的醛肟得到的异羟肟酰氯转化为对应的脒氧化物，作为中间体得到的此脒氧化物不经纯化与适当取代的烯或炔反应，进行 1, 3 - 二极环加成，形成式 I 的 2 - 异恶唑啉或异噁唑，如果需要，产生的产物通过结晶或色谱纯化，或

b) 根据 a) 或 o) 制备的式 I 的羧酸酯，或通过方法 h) 或 k) 额外引入的酯基，被水解为羧酸，或

c) 根据方法 a) 或 o) 制备的式 I 的羧酸烷基酯用适当取代的伯胺或仲胺转化为对应的酰胺，或

d) 根据 a) 或 o) 制备的式 I 的次膦酸一烷基酯或膦酸二烷基酯被水解为膦酸半酯，膦酸或次膦酸，或

e) 根据 b) 得到的羧酸首先被转化为活化的酸衍生物，此衍生物随后用醇酯化，或用伯胺或仲胺转化为对应的酰胺，或用 N - 烷基化的羟胺转化为对应的羟基酰胺，或

f) 在方法 a), b), h), e), o) 或 g) 中中间得到的或携带的 N - 保护基或 O - 保护基被消除，或被引入的羧酸，次膦酸，膦酸或磷酸酯被相应水解，得到式 I 化合物，或

g) 根据方法 f) 或 o) 得到的，并具有游离氨基的化合物通过与异氰酸酯反应转化为相应的脲衍生物，或通过与活化的羧酸衍生物或 N - 保护的氨基酸反应转化为相应的酰胺，或通过与磺酰氯反应转化为对应的磺酰胺，或

h) 根据方法 a), o) 或 f) 得到的，具有游离醇基的化合物通过与异氰酸酯反应转化为相应的脲烷，或通过与在羧基上被活化并可进一步带有官能团的羧酸衍生物或相应的 N - 保护的氨基酸衍生物反应转化为相应的酯，或用二烯酮转化为相应的 3 - 氧代丁酸酯，或通过与卤代化合物如 α - 卤代羧酸反应转化为相应的醚，或

i) 根据方法 a), o) 或 f) 得到的，具有伯或仲醇基的化合物被氧化为相应的醛或酮，或

k) 根据方法 i) 制备的羰基化合物通过与碱和二烷基膦酰基乙酸酯反应转化为巴豆酸衍生物, 或通过与四烷基亚甲基二膦酸酯反应转化为相应的反式-2-(二烷氧基膦酰基) 乙烯基衍生物, 或 l) 在环加成期间引入的环氧基被转化为相应的 1, 2-二醇, 或 m) 根据方法 g) 制备的, 含有 3H-异噁唑环的酰胺通过用碱处理进行开环, 转化为 2-氨基-3-羟基巴豆酰胺, 或 n) 根据方法 a) - m) 制备的, 由于其化学结构而以对映体形式存在的式 I 化合物通过与对映体纯的酸或碱成盐, 在手性固定相上层析, 或用手性对映体纯的化合物如氨基酸衍生, 分开这样得到的非对映体, 消除手性辅助基, 被拆分为纯对映体, 或 o) 通过与手性或外消旋烯环加成得到的式 I 的 2-异噁唑啉非对映异构的混合物通过硅胶柱色谱被拆分为纯的非对映异构体, 或 p) 根据方法 a) - o) 制备的式 I 化合物可以以游离形式被分离, 或如果需要, 当有酸或碱基存在时, 被转化为生理耐受盐, 或 q) 根据方法 h) 制备的, 带有其它官能团如卤代甲基的化合物被用伯或仲氨基烷基化, 或用醇酯化。

从式 I 化合物, 包括其可以形成盐的立体异构形成制备生理耐受盐以本身已知的方式进行。羧酸, 膦酸和次膦酸, 以及膦酸半酯, 与碱性试剂如氢氧化物, 碳酸盐, 碳酸氢盐或醇盐, 以及氨或有机碱例如三甲胺, 三乙胺或乙醇胺, 以及碱性氨基酸, 例如赖氨酸, 鸟氨酸或精氨酸形成稳定的碱金属盐, 碱土金属盐或非强制性取代的铵盐。至于在 R^1 或 R^2 基团中有碱性基团的式 I 化合物, 也可用强酸制备稳定的酸加成盐。无论无机酸或有机酸, 如盐酸, 氢溴酸, 硫酸, 磷酸, 甲磺酸, 苯磺酸, 对甲基磺酸, 4-溴苯磺酸, 环己基酰氨基磺酸, 三氟甲磺酸, 乙酸, 草酸, 酒石酸或三氟乙酸都适于此目的。

用作 1, 3-二极环加成原料化合物的腈氧化物的制备和转化描述于最近的专题文章 (K. P. G. Torsell: Nitrile Oxides, Nitrones and Nitronates in Organic Synthesis, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1988) 中。用作前体的异羟肟酰卤可根据

文献的已知方法，通过卤化相应的醛肟，或在氯氧亚氨基乙酸酯的情况下，经重氮化反应从甘氨酸烷基酯得到（G. S. Skinner, J. Am. Chem. Soc. 64 (1924), 731）。如果次氯酸叔丁酯被用于氯化醛肟，不需要分离相应的异羟肟酰氯。也可被使用的硝基化合物在一些情况下是从文献已知的，或由文献已知其原理的方法制备，例如，4-硝基丁酸酯由氧化物催化的或碱催化的硝基甲烷与丙烯酸衍生物的加成得到（D. W. Chasar, Synthesis 1982, 841-42; N. Ono, Synthesis 1984, 226-227）。

从文献已知的产量可被显著提高，一般表现为难于分离的副产物的双加合物的形成在很大程度上通过用1, 8-二氮杂双环[5.4.0]十一碳-7-烯（DBU）作为碱以特殊方式进行反应而防止。

作为反应物的非强制性取代的烯或炔衍生物作为母体物质，绝大部分已知并从文献也可购得。适当的指导在实施例中给出。容易低聚的腈氧化物的生产有利地在烯属或炔属反应物存在下不经任何中间体分离，“就地”进行。当它们从硝基化合物根据 Mukaiyama 的方法生产时，芳族异氰酸酯，例如异氰酸苯酯或二异氰酸根合苯，被优选用于脱水。在此情况下，可以有利地在非质子溶剂或对反应物惰性的分配剂，如乙酸乙酯，二甲基甲酰胺，二甲基乙酰胺，二烷基醚，四氢呋喃，卤代烃，例如二氯甲烷，氯仿或二氯乙烷，烃，如己烷，环己烷，苯，甲苯或其它取代的芳族化合物中进行，上述溶剂的混合物也是合适的。有机或无机，碱如叔胺，碱金属碳酸盐或碱金属氢氧化物被用于从异羟肟酰卤生产腈氧化物。在此情况下，当有机碱被使用时，反应优选地在上述非强制性氯代的脂族或芳族烃或脂族，以及环状醚中进行，而且，当无机碱被使用时，反应也可在两相溶剂混合物，例如乙酸乙酯/水或二氯甲烷/水中进行。腈氧化物的制备和环加成一般在 -20°C 至 $+80^{\circ}\text{C}$ 的温度，然而，优选 0° 至 $+40^{\circ}\text{C}$ 进行。

夹带在环加成中，或通过进一步反应的方或被随后引入的烷基酯水解越相应羧酸通常用可以等摩尔量或过量使用的碱水溶液，在水溶液中，或者，如果原料化合物难溶于水，在水/有机溶剂混合

物中实现，水/醇混合物已被证明具有特殊价值。

在通式 I 中的取代基 R^1 或 R^2 中带入的胺，醇或羧酸保护基的裂解通常根据在肽化学上已知的方法进行，在优选使用的叔丁氧羰基的情况下，酸性消除，例如用醇溶解的盐酸或三氟乙酸是优选的，而低级烷基酯优选地在碱性条件下裂解。

磷酸酯和次磷酸酯向相应的游离酸的转化在酸性条件下，优选在无水介质中实现，例如在有机酸如乙酸中用氢溴酸，或在非质子溶剂中用三甲基溴代甲硅烷或三甲基碘代甲硅烷实现，卤代烃优选地被应用。在此情况下， 0° 至 50°C 被选作反应温度以确除裂解在温和条件下进行。磷酸半酯通常通过将磷酸二酯进行碱性水解而制备。

在 R^1 或 R^2 中具有游离羧酸官能团的式 I 化合物在羧基适当活化后，可以用本身已知的方法用伯或仲胺，也可用 N-烷基化的羟胺或 5-氨基四唑转化为相应的酰胺。

在 R^1 或 R^2 中具有游离醇或胺官能团的式 I 化合物可用活化的羧酸衍生物如酰卤或酸酐转化为相应的酯或酰胺。相应的酯或酰胺也可从 N-保护的氨基酸得到。在此情况下，由肽化学已知的方法有利地用于活化氨基酸成分，例如，羟基苯并三唑/二环己基碳二亚胺法 (W.Köning, R. Geiger, Chem. Ber, 103(1970), 2034-2040) 或用丙基磷酸酐 (PPA) 活化，也可以用氯代烃，如二甲基甲酰胺，作为溶剂 (除脂族和环状醚之外)。叔胺，如三乙胺，N-乙基吗啉或吡啶优选作为辅助的碱。反应在 -10°C 至 $+50^\circ\text{C}$ ，优选在 0°C 至 $+20^\circ\text{C}$ 的温度范围进行。

至于以被保护的形式存在的酰基衍生物需要为游离的氨基官能团或羧酸官能团形式，相应的保护基可以通过已在上面对述的方法单个或一起除去。

除此之外，在 R^1 或 R^2 中具有游离醇或胺官能团的式 I 化合物可通过加入适当取代的异氰酸酯转化为脲烷衍生物或脲衍生物。与异氰酸酯加入有关，或作为附加官能团被引入的酯基可如上所述被转化为相应的羧酸。

具有游离伯或仲醇官能团的化合物可以简单地通过称为“Swern 氧化”的方法，用二甲基砷和草酰氯氧化为相应的醛或酮。在此情况下，副反应如苯酚环的氧化或 2-异噁唑啉环的氧化降解可通过在低温适当地进行反应而避免。这样得到的羰基化合物可用碱和 CH-酸性化合物，如二烷基膦酰基乙酸烷基酯或四烷基亚甲基二膦酸酯，进行缩合而转化为相应取代的反应烯烃。

至于以非对映异构或对映异构形式存在的式 I 化合物，和它们在选择合成中的混合物，它们拆分为纯立体异构体既可通过在手性或非手性载体上层析的手段，对于式 I 的外消旋化合物也可以通过将光学活性的碱或酸作为辅助物质形成的非对映异构盐分级结晶实现。通过薄层色谱或柱色谱拆分一般以外消旋形式存在的，在 5-位具有不对称（原子的）-异噁唑啉的对映异构体的合适手性固定相的例子有修饰的硅胶载体（所谓 Pickle 相）以及高分子碳水化合物，例如三乙酰基纤维素。适当衍生后，如本专业技术人员已知的，在手性固定相上的气相色谱法也可用于分析的目的。为了拆分外消旋羧酸，膦酸和次膦酸的对映异构体，不同溶解性的非对映异构体盐用一般可购得的光学活性的碱，例如，(-)-烟碱，(+)-和(-)-苯基乙胺，奎林碱，L-赖氨酸或 L-和 D-精氨酸形成，较难的成分作为固体被分离，较易溶的非对映异构体被从母液分出，纯的对映异构体被从以这种方式得到的非对映异构体盐中分离。

含有碱基如氨基的式 I 的外消旋化合物可以用原理相同的方式，用光学活性的酸如(+)-樟脑-10-磺酸，D-和 L-酒石酸，D-和 L-乳酸或(+)-和(-)-扁桃酸转化为纯对映异构体。含有醇或胺官能团的手性化合物也可用适当活化或非强制性 N-保护的的对映异构纯的氨基酸转化为相应的酯或酰胺，或相反地，手性羧酸可用羧基保护的的对映异构纯的氨基酸转化为酰胺，或用对映异构纯的羟基羧酸如乳酸转化为相应的手性酯。引入对映异构纯形式中的氨基酸残基或醇基然后可用于拆分异构体，通过结晶或在合适固定相上层析拆分现在为非对映异构体的异构体，然后用

合适的方法再次消除带有的手性分子部分。

本发明也涉及药物，其特征在于至少一种式 I 化合物和/或式 I 化合物的立体异构形式和/或式 I 化合物的生理耐受盐的有效成份，加上药用和生理耐受的赋形剂，佐剂和/或活性化合物和辅助物质。根据本发明的药物可静脉内，肠胃外，局部，直肠或口服给药。

根据本发明的药物优选地适于预防和/或治疗气喘病，炎症和自身免疫疾病。

这些包括，例如，肌肉，关节或胃肠道的急性和慢性炎症，变应性呼吸道疾病，牛皮癣或自身免疫病，例如周身红斑狼疮（SLE），II 型糖尿病，重症肌无力，Sjögren's 综合症、皮肤肌炎，硬皮病或多发性硬化（MS）。

本发明也涉及制备本发明药物的方法，其中至少一种式 I 化合物与药用和生理耐受的赋形剂，和如果合适，进一步有合适的活性化合物，佐剂或辅助物质一起被制成给药的合适形式。

制剂合适的固体或液体药物形式的例子有粒剂，粉剂，包衣片剂，片剂，（微）胶囊，栓剂，糖浆，液汁，悬浮液，乳剂，滴剂或注射液以及缓释活性化合物的制剂，在形成的制剂中，常用佐剂，如载体物质，崩解剂，粘接剂，包衣剂，膨胀剂，滑动剂，润滑剂，调味剂，甜味剂和增溶剂被使用。可被提到的常用辅助物质的例子有碳酸镁，二氧化钛，乳糖，甘露糖醇和其它糖，滑石，牛奶蛋白，明胶，淀粉，纤维素及其衍生物，动物和植物油，如鳕鱼肝油，葵花籽油，花生油或芝麻油，聚乙二醇和溶剂，例如，灭菌水和一元或多元醇，例如甘油。

药物制剂被优选地以剂量单位制备并给药，每单位含有规定剂量的本发明式 I 化合物作为活性成份。在固体剂量单位的情况中，如片剂，胶囊剂，包衣片剂或栓剂，该剂量可高达约 1000mg，然而优选地，约 50 至 300mg，而在以安瓿形式的溶液的情况中，高达约 300mg，然而，优选地约 10 至 100mg。

依据式 I 化合物在人和动物中的活性，约 50 至 3000mg 活性

化合物，在口服给药的情况下，日剂量优选地约 150 至 1000mg，在静脉内给药的情况下，约 50 至 1000mg，优选约 100 至 300mg，日剂量被定为治疗体重约 70kg 的成年患者。然而，有时也适于更高或更低日剂量给药。日剂量既可以单剂量单位形式也可以几个较小剂量单位，或在固定的间隔给予再分的剂量。最后，式 I 化合物和/或（如果合适）其生理耐受盐也可被配制，当制备上述药物给药形式时，与其它合适活性化合物，例如血流促进物质，血小板凝集抑制剂，血小板聚集抑制剂，钙拮抗剂，抗血小板剂，抗高血脂剂，神经保护剂，止痛剂，镇静剂，抗抑郁剂，抗炎剂，抗咽痛剂，强心剂，抗心律失常剂，利尿剂，抗高血压剂，包括 β - 受体阻断剂和钙阻断剂，血浆膨胀剂和其它血管治疗剂一起配制。

下述制备实施例的结构式，与熔点和 ^1H - NMR 数据一起列于表 1 中。如果立体异构形式存在，相对构型以结构式给出。下列 NMR 谱的 δ 值以 ppm 给出。

实施例 1

3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 5 - 羟甲基 - 2 - 异噁唑啉
a) 3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基) 苯甲醛肟

该肟用文献 (Houben-Weyl: Meth. d. Org. Chem. (Methods of Organic Chemistry), Vol. X/4, pp.55ff), 已知的方法, 从 3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基) 苯甲醛制备。

b) 与腈氧化物的 1, 3 - 二极性环加成

将 24.9g (0.1mol) 在 a) 中制备的醛肟溶于 250ml 二氯甲烷中, 在冷却下滴加 12.0g (0.11mol) 次氯酸叔丁酯, 一旦滴加完成, 混合物在室温下搅拌 45 分钟。加入 11.6g (0.2mol) 烯丙醇之后, 慢慢滴加(6 小时内) 溶于 150ml 二氯甲烷中的 16.7ml (0.12mol) 三乙胺。将混合物搅拌过夜, 用水, 稀柠檬酸, 和 NaCl 溶液洗涤, 硫酸钠干燥并减压浓缩。通过从甲基叔丁基醚/石油醚结晶以晶体形式得到产物。产量: 13.1g

在后面表 1 中所述的实施例: 2, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 35, 44, 48, 66, 67, 68,

69, 78, 79 和 80 类似于实施例 1 通过就地制备的腈氧化物与相应的烯或炔环加成制备。

在粗产物的情况下, 它最初表现为油状物, 硅胶层析, 用甲基叔丁基醚/石油醚或乙酸乙酯/石油醚混合物洗脱, 并随后结晶, 也已被证明有价值。

关于列于表 1 中实施例合成的特色:

关于实施例 2):

烯结构成份的合成在 EP0220573 中叙述。

关于实施例 8):

3 - 乙烯基噻吩: CAS No. 13679-64-6

关于实施例 11):

对丙烯酸甲酯环加成。用过量的饱和氨甲醇溶液在室温下转化为酰胺。

关于实施例 14):

对 N - (3, 5 - 二甲基 - 4 - 羟基苄基) 异丁烯酰胺 (合成描述于 DE3820699 中)。

关于实施例 15):

属于非立体选择性环加成, 产物表现为非对映异构体混合物。

关于实施例 16 和 17):

与对丁二烯 - 氧化物环加成关联的外消旋赤或/苏式非对映体混合物通过硅胶色谱的手段拆分为非对映异构体, 用石油醚/乙酸乙酯 9:1 洗脱, 并随后结晶 (实施例 16: 外消旋赤式异构体, 实施例 17: 外消旋苏式异构体)。

关于实施例 18 - 20):

通过对 1 - 丁烯 - 3 - 醇环加成的外消旋赤式/苏式非对映异构混合物 (实施例 18) 通过硅胶色谱拆分为非对映异构体, 用石油醚/甲基叔丁基醚 5:1 洗脱 (实施例 19: 外消旋赤式异构体, 实施例 20: 外消旋苏式异构体)。

关于实施例 21 - 22):

通过对 1 - 丁烯 - 3 - 醇乙酸酯环加成的外消旋赤式/苏式非对映异

构体混合物通过硅胶色谱拆分为非对映异构体，用石油醚/乙酸乙酯 19:1 洗脱（实施例 21：外消旋赤式异构体，实施例 22：外消旋苏式异构体）。

关于实施例 23)：

用丙烯酸叔丁酯进行环加成。叔丁基酯基用三氟乙酸在二氯甲烷中室温下消去。浓缩后，可以从甲基叔丁基醚/石油醚中结晶产物。

关于实施例 35)：

烯结构成份的合成描述于 EP0220573 中。

关于实施例 48)：

用 N - 叔丁氧羰基炔丙基胺进行环加成。N - 保护基团随后用三氟乙酸消除。可以三氟乙酸盐的晶体形式从甲醇/甲基叔丁基醚得到产物。游离的碱通过用二氯甲烷从稀 NaOH 水溶液中萃取，并干燥和浓缩有机层得到。

关于实施例 78)：

用 6 - 庚烯 - 2, 4 - 二醇进行环加成。由 NMR 谱确定为异构纯的产物通过用甲基叔丁基醚/石油醚硅胶层析，随后从上述溶剂重复结晶得到。

关于实施例 79 和 80)：

类似于实施例 1) 用过量 1, 6 - 庚二烯 - 4 - 醇进行环加成。通过用石油醚/乙酸乙酯混合物（梯度 6:1 - 2:1）硅胶层析的手段拆分为非对映异构体。用 NMR 谱不可解分辨苏式/赤式异构体。

实施例 3

2 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 5 - 基甲氧基) 甲基丙酸

将 4.0g (0.095mol) 实施例 2 的产物溶于 80ml 甲醇中，加入 25ml 1N NaOH 水溶液；一旦水解完成（用 TLC 监测），混合物用 25ml 1N HCl 酸化。沉淀的产物被过滤，水洗并干燥。产量： 3.0g

实施例 4

N - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 5 - 基甲氧基羰基) 甘氨酸

a) 与异氰酸酯反应

将 5.5g (0.018mol) 实施例 1 的产物溶于 5ml 二氯甲烷中, 加入 3.2g (0.025mol) 异氰酸根合乙酸乙酯和约 4 滴三乙胺, 混合物在搅拌下于 50 - 60 °C 加热。一旦反应完成 (用 TLC 监测), 混合物被浓缩并用甲基叔丁基醚/石油醚硅胶层析。产量: 7.2g 油状产物

b) 乙基脂的水解

7.2g a) 的产物, 如实施例 3) 中所述, 用过量的 1N NaOH 水解, 酸化后, 以晶体形式分离。产量 4.56g

实施例 6

3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 5 - 基膦酸

5.0g (0.013mol) 实施例 5 的产物在室温用约 100ml HBr 在冰乙酸中的 33 % 溶液处理, 直到反应完全 (用 TLC 监测)。浓缩后残留物与甲基叔丁基醚充分搅拌。产量: 3.15g。

实施例 7

3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 5 - 基膦酸
甲基酯

5.0g (0.013mol) 实施例 5 的产物在室温下被溶于 100ml 甲醇中。加入 30ml 1N NaOH, 混合物被搅拌 15 小时 (用 TLC 监测)。酸化 (1N HCl) 后, 用二氯甲烷萃取, 接着用水和饱和氯化钠溶液洗涤, 干燥并浓缩。残余物从甲基叔丁基醚/石油醚中结晶。产量: 3.4g。

实施例 21 和 22 (另一合成)

1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 5 - 基) 乙基乙酸酯 (分别为赤式或苏式异构物)

将 2.5g (0.008mol) 实施例 19 或 20 的产物溶于 100ml 二氯甲烷和 6ml 吡啶中。加入 125mg 4 - 二甲基氨基吡啶后, 在冰冷却下滴加溶于 10ml 二氯甲烷中的 1.35ml (0.024mol) 乙酰氯; 一旦反应完成 (用 TLC 监测), 将混合物用水, 硫酸氢钾水溶液和水洗涤, 干燥并浓缩。残留的油状物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。

实施例 33

(1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基) - 1 - 甲基乙氧基) 乙酸乙酯

在保护性气体中,冰冷却下,溶于40ml无水二甲基甲酰胺中的10.0g (0.03mol) 实施例29的产物被滴加到1.06g (0.044mol) 氯化钠在30ml无水二甲基甲酰胺中的悬浮液中。在没有冷却下经另30分钟后,溶于30ml无水二甲基甲酰胺中的10.8g (0.044mol) 溴代乙酸乙酯被滴加到混合物中,混合物然后被再搅拌4小时。反应混合物然后被倒入冰中,用乙酸乙酯萃取。水洗,干燥并浓缩。油状残余物从石油醚结晶。产率: 6.8g。

实施例34

(1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基) - 1 - 甲基乙氧基) 乙酸

3.7g (0.009mol) 实施例33的产物类似实施例3水解。产量: 2.9g。

实施例36

2 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基甲氧基) - 2 - 甲基丙酸

9.5g (0.023mol) 实施例35的产物类似于实施例3水解。产量: 6.6g。

实施例37

N - 甲基异羟肟酰基 - 2 - ((3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基甲氧基) 2 - 甲基丙酸酯

4.0g (0.01mol) 实施例36的产物类似于文献 (EP0199151) 的方法,用草酰氯和N - 甲基羟胺衍生。产物从甲基叔丁基醚结晶。产量: 2.7g。

实施例38

2 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基甲氧基) - N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 异丁酰胺

6.0g (0.015mol) 实施例36的产物类似于文献 (J. Org. Chem., 34 (1969), 2766 - 2767) 的方法用1.7ml (0.015mol) 四氯化硅和无水吡啶中的1.25g (0.015mol) 5 - 氨基四唑衍生。产物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量: 3.9g。

实施例 39

N - (3 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基甲氧羰基) 甘氨酸乙酯

14.0g (0.046mol) 实施例 24 的产物类似于实施例 4a) 反应。残留的油状物用甲基叔丁基醚/石油醚 1:4 硅胶层析纯化。产量: 16.4g 。

实施例 40

N - (3 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基甲氧羰基) 甘氨酸

7.1g (0.06mol) 实施例 39 的产物类似于实施例 3 水解。产率: 4.1g 。

实施例 41

N - (3 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基丙氧羰基) 甘氨酸乙酯

8.0g (0.024mol) 实施例 26 的产物类似于实施例 4a) 反应。残留油状物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶纯化。产量: 6.1g 。

实施例 42

N - (3 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基丙氧羰基) 甘氨酸

4.0g (0.0089mol) 实施例 41 的产物类似实施例 3 水解。产量: 2.8g 。

实施例 43

N - (2 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基乙氧羰基) 甘氨酸

6.25g 实施例 25 的产物类似于实施例 4a) 反应。残留的产物类似于实施例 3 水解, 并用甲基叔丁基醚硅胶层析, 并最终从甲基叔丁基醚/石油醚结晶纯化。产量: 3.8g 。

实施例 45

3 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基丙酸

4.3g (0.011mol) 实施例 44 的产物被类似于实施例 3 水解。

产量： 3.0g。

实施例 46

3 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基)
- N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 丙酰胺

7.0g (0.02mol) 实施例 45 的产物用四氯化硅和无水吡啶中的 5 - 氨基四唑类似于实施例 38 衍生。产物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产率： 6.5g。

实施例 47

3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基丙烯酸
a) Swern 氧化形成醛

在 - 60 ℃ 和保护性气体中，将 25.4g (0.2mol) 草酰氯首先引入 250ml 无水二氯甲烷中，然后滴加溶于 20ml 无水二氯甲烷中的 31.2ml (0.044mol) 二甲亚砷。30 分钟后，在 - 50 ℃ 和 45 分钟内，滴加溶于 200ml 无水二氯甲烷/20ml 二甲基甲酰胺中的 30.3g (0.1mol) 实施例 24 的产物，混合物随后搅拌 20 分钟。加入 55.6ml (0.4mol) 三乙胺之后，移走冷浴，混合物随后在室温搅拌 1 小时，用水，稀柠檬酸水溶液和 NaCl 溶液洗涤，干燥并浓缩。残留的油状物用甲基叔丁基醚/石油醚 1:9 硅胶层析，并从石油醚结晶。产量： 16.4g。

b) 烯化

在 0 ℃ 和保护性气体下，将 0.77g (0.032mol) 氢化钠首先引入 40ml 无水四氢呋喃中，然后 8 滴加溶于 50ml 无水四氢呋喃中的 5.05g (0.024mol) 二乙基膦基乙酸甲酯，产生的悬浮液随后在 0 ℃ 搅拌 1 小时；然后滴加溶于 50ml 无水四氢呋喃中的 4.8g (0.016mol) 实施例 47a) 的产物，混合物随后再搅拌 2 小时，倒入冰水中，用二氯甲烷萃取几次，水洗，干燥并浓缩。产物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量： 4.2g。

c) 水解

3.7g (0.01mol) 实施例 47b) 的产物类似于实施例 3 水解。产量： 3.3g。

实施例 49

N - (3 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异恶唑 - 5 - 基甲基) 三氟甲磺酰胺

在冰冷却下, 溶于 50ml 无水二氯甲烷中的 3.6g (0.012mol) 实施例 48 产物的碱形式被首先引入, 随后加入 3.95g (0.014mol) 三氟甲磺酸酐, 和 2.2ml (0.017mol) N - 乙基吗啉; 混合物随后搅拌过夜, 用水, 稀柠檬酸水溶液和 NaCl 溶液洗涤, 干燥并浓缩。残留的油状物用甲基叔丁基醚/石油醚 3:1 硅胶层析, 并从甲基叔丁基醚/石油醚结晶纯化。产量: 2.1g。

实施例 50

N - (3 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异恶唑 - 5 - 基甲基) 氨基草酸乙酯

在冰冷却下, 9.1g (0.03mol) 实施例 48 的产物的碱形式, 在无水四氢呋喃中, 与 3.9ml (0.035mol) (氯代甲酰基) 甲酸乙酯和 9.7ml (0.07mol) 三乙胺以类似于文献 (J. Med. Chem., 34 (1991), 600) 的方法酰化。加入冰水后, 用乙酸乙酯萃取, 用水, 稀柠檬酸水溶液和 NaCl 溶液洗涤, 接着干燥并浓缩。残留的油状物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量: 9.1g。

实施例 51

N - (3 - (4 - 羟基 - 3 , 5 - 二叔丁基苯基) 异恶唑 - 5 - 基甲基) 氨基草酸

5.0g (0.012mol) 实施例 50 的产物类似于实施例 4b) 水解。表现为油状物的产物通过用二氯甲烷萃取, 用水和 NaCl 溶液洗涤, 干燥并浓缩分离。残留的非晶状产物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量: 3.4g。

实施例 52

5 - 甲基异恶唑 - 4 - 甲酸 (3 - 4 - 羟基 - 3 , 4 - 二叔丁基苯基) 异恶唑 - 5 - 基甲基) 酰胺

在冰冷却下, 5.0g (0.0165mol) 实施例 48 产物的碱形式与 2.2ml (0.017mol) N - 乙基吗啉首先引入 80ml 无水四氢呋喃

中,然后滴加溶于 10ml 四氢呋喃中的 2.5g (0.017mol) 5 - 甲基异噻唑 - 3 - 基甲酰氯; 混合物在室温搅拌 5 小时。加入冰水并用二氯甲烷萃取后, 用水, 稀柠檬酸水溶液和 NaCl 溶液洗涤, 接着干燥并浓缩。得到的油状物用甲基叔丁基醚/石油醚 1:1 硅胶层析纯化并从石油醚结晶。产量: 4.9g。

实施例 53

2 - 氨基 - 3 - 羟基丁 - 2 - 烯甲酸 (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噻唑 - 5 - 基甲基) 酰胺

将 4.0g (0.01mol) 实施例 52 的产物溶于 50ml 无水四氢呋喃中, 在冰冷却下加入 20ml 1N NaOH; 一旦反应完成 (由 TLC 监测), 混合物用 22ml 1N HCl 酸化, 用二氯甲烷萃取; 接着洗涤, 干燥并浓缩。残留物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量: 3.3g。

实施例 54

(3 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噻唑 - 5 - 基甲基) 脲基) 乙酸乙酯

在 50 - 60 °C, 搅拌下, 14.2g (0.047mol) 实施例 48 产物的碱形式与 6.5g (0.05mol) 异氰酸根合乙酸乙酯一起加热。一旦反应完成 (用 TLC 监测), 混合物被浓缩, 并从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量: 11.3g。

实施例 55

L - 苯丙氨酸基 - N - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噻唑 - 5 - 基甲基) 酰胺盐酸盐

a) 用 N - 叔丁氧羰基苯丙氨酸酰化

将 5.3g (0.02mol) N - 叔丁氧羰基苯丙氨酸溶于 100ml 无水四氢呋喃中, 加入 4.5g (0.022mol) 二环己基碳二亚胺和 3.1g (0.02mol) 1 - 羟基苯并三唑水合物, 混合物被搅拌约 45 分钟。将沉淀出的脲滤出。加入 2.3ml (0.018mmol) N - 乙基吗啉后, 滴加溶于 50ml 四氢呋喃中的 6.25g (0.015mol) 实施例 48 的产物。4 小时后, 加入乙酸乙酯, 用 0.1N HCl 和饱和 NaCl 溶液洗涤, 干燥并浓缩。粗产物通过硅胶色谱 (甲基叔丁基醚) 进一步纯化。

产量： 8.9g N - 叔丁氧羰基保护的产物油状物。

b) 消除保护基

通过用二氯甲烷 (150ml) 中的三氯乙酸 (25ml) 处理，浓缩并蒸发几次，加入乙醚中的盐酸后，接着与石油醚充分搅拌，消除保护基，并转化为盐酸盐。产量： 6.3g 非晶状盐酸盐。

实施例 56

(3 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基甲基) 脲基) 乙酸

6.5g (0.015mol) 实施例 54 的产物类似于实施例 3 水解。产量： 5.7g

实施例 57

2 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基) 乙烯基膦酸二乙酯

反应在无水四氢吡喃中，以文献 (J. Med. Chem., 32 (1989), 2171) 的方法，从 6.4g (0.021mol) 实施例 47a) 的产物， 6.25ml (0.025mol) 四乙基亚甲基二膦酸酯和 9.6ml (0.024mol) .5M 丁基锂溶液进行。反应完成后，反应混合物被倒入冰水中，用二氯甲烷萃取几次；水洗，干燥并浓缩。产物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量： 7.9g。

实施例 58

2 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基) 乙烯基膦酸

在保护性气体和室温下，将 4.0g (0.009mol) 实施例 57 的产物在 300ml 无水二氯甲烷中与 3.9ml (0.03mol) 三甲基溴代甲基硅烷一起搅拌，直至反应完成 (由 TLC 监测) 。加入 0.5ml 水之后，混合物被浓缩；剩余物在甲醇中处理几次并减压浓缩。油状物与甲基叔丁基醚搅拌直至保留晶状残渣。产量： 3.0g。

实施例 59

3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 5 - 乙酰基异噁唑

5.0g (0.016mol) 实施例 28 的产物类似于实施例 47a) 进行

Swern 氧化。产量：3.88g。

实施例 60

3 - (4 - 吡啶基) - 5 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基)
- 2 - 异噁唑啉

a) 2, 6 - 二叔丁基 - 4 - 乙烯基苯酚

烯的合成是已知的：(P. Grosso, O.Vogl: J.Macromol. Sci. Chem., A23 (1986), 1041 - 1056)。

b) 作为腈氧化物前体的异羟肟酰氯

4 - 吡啶基异羟肟酰氯以类似于文献的方法 (Bull. Soc. Chim. France (1962), 2215) 通过将吡啶 - 4 - 甲醛肟氯化制备。

c) 环加成

11.6g (0.05mol) a) 的产物和 9.7g (0.05mol) 实施例 60b) 的产物被首先引入 500ml 二氯甲烷中，然后在 6 小时内滴加溶于 200ml 二氯甲烷中的 20.9ml (0.15mol) 三乙胺。如实施例 1 处理。产量：13.1g。

实施例 61

3 - (2 - 噻唑基) - 5 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基)
- 2 - 异噁唑啉

5g (0.039mol) 2 - 噻唑基甲醛肟 (制备： A. Dondoni, Synthesis (1987), 998 - 1001) 如实施例 1 所述，用次氯酸叔丁酯在二氯甲烷/二甲基甲酰胺 (1:1) 中氯化，然后加入 16.3g (0.07mol) 实施例 60a) 的烯，并根据实施例 1 进行环加成。残留的油用甲基叔丁基醚/石油醚 1:2 硅胶层析并从甲醇/少量水结晶纯化。产量：6.4g。

实施例 62

3 - 羧基 - 5 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉

a) 作为腈氧化物前体的异羟肟酰氯

氯氧亚氨基乙酸乙酯通过文献 (G. S. Skinner, J. Am. Chem. Soc., 46 (1924), 731) 的方法从甘氨酸乙酯制备。

b) 用乙氧羰基脒氧化物环加成

将溶于 80ml 二氯甲烷中的 4.55g (0.03mol) 实施例 62a) 的产物在 6 小时内滴加到 4.65g (0.02mol) 实施例 60a) 的烯和 5.6ml (0.04mol) 三乙胺在 100ml 二氯甲烷中的溶液中。根据实施例 1 处理。产量: 4.8g。

c) 乙酯的水解

类似于实施例 3 进行水解和处理。从实施例 62b) 的 6.0g (0.017mol) 产物得到 3.55g 晶状羧酸。

对于下面实施例 63 和 65 的环加成步骤, 硝基丁酸结构成份以 Mukaiyama 方法的变种 (J. Am. Chem. Soc., 82 (1960), 5339 - 5342) 用异氰酸酯脱水。从丙烯酸衍生物和硝基甲烷进行的合成途径对不能以商品得到的衍生物和下面硝基丁酸叔丁酯所述的衍生物是代表性的。当相应的取代的乙烯基膦酸酯和乙烯基膦酸被使用时, 此方法也可用于 4-硝基丙基次膦酸和 4-硝基丙基膦酸的衍生物。

实施例 63

5 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 3 - 基丙酸

a) 硝基丁酸叔丁酯

在浴温 70 °C 下, 将 537ml (3.7mol) 丙烯酸叔丁酯被滴加到首先引入的 2.0l 硝基甲烷和 7ml 1.8 - 二氮杂双环 [5.4.0] 十一碳 - 7 - 烯 (DBU) 的溶液中, 由于痕量丙烯酸而可能下降的 pH 通过加入适量 DBU 保持不变。放热反应被停止后 (上升到 90 °C), 混合物被冷却 60 分钟, 然后用稀盐酸和水洗涤几次, 干燥并减压浓缩, 残留的 660g 浅红棕色油状物通过蒸馏 (bp₅: 90 °C) 进一步纯化。

下列硝基化合物用相同途径制备: 3 - 硝基丙基膦酸的二甲基和二乙基酯 (从乙烯基膦酸酯进行), 3 - 硝基丙基 - P - 甲基次膦酸乙酯 (乙烯基 - P - 甲基次膦酸乙酯进行)。

b) 环加成

在 50 °C 下，7.0g (0.03mol) 实施例 60a) 的烯首先引入带有 0.5ml 三乙胺和 6.4g (0.04mol) 二异氰酸亚苯基酯的 80ml 甲苯中。7.6g (0.04mol) 在 a) 中所述的 4 - 硝基丁酸叔丁酯，和 0.2ml 三乙胺被溶于 80ml 甲苯中，并在 5 小时内滴加。混合物在室温搅拌过夜；沉淀出的脲然后抽滤出来，并用二氯甲烷洗涤。浓缩后，保留的油状粗产物通过硅胶色谱（洗脱剂：石油醚/甲基叔丁基醚混合物）纯化。

c) 消除羧基保护基

5g (0.012mol) b) 的产物在室温下在 80ml 二氯甲烷中用 20ml 三氟乙酸处理，直至反应完全（约 3 小时）。浓缩后，剩余物与甲基叔丁基醚充分搅拌，得到 3.6g 晶状产物。

实施例 64

5 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基) 苯基 - 2 - 异噁唑啉 - 3 - 丙酸 N - (1H - 四唑 - 5 - 基) 酰胺

5.0g (0.15mol) 实施例 63 的产物根据实施例 38，用四氯化硅和 5 - 氨基四唑在无水吡啶中衍生。产物从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量：3.5g。

实施例 65

(2 - (5 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 3 - 基) 乙基) 甲基次膦酸

环化根据实施例 63，从 3 - 硝基丙基 - P - 甲基次膦酸乙酯进行。次膦酸酯基根据实施例 7 在碱性条件下裂解。

实施例 70

L - 苯丙氨酸 - 1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异噁唑 - 5 - 基) 乙基酯盐酸盐

a) 用 N - 叔丁氧羰基苯丙氨酸酰化

将 2.65g (0.01mol) N - 叔丁氧羰基苯丙氨酸溶于 50ml 无水四氢呋喃中，然后加入 1.53g (0.01mol) 1 - 羟基苯并三唑水合物和 2.27g (0.011mol) 二环己基碳二亚胺，混合物被搅拌约 45 分钟。加入 0.12g 4 - 二甲基氨基吡啶之后，溶于 25ml 四氢呋

喃中的 3.17g (0.01mol) 实施例 2g 的产物被滴加。再过 2 小时后，如下处理：加入乙酸乙酯，用 0.1N NaOH，0.1N HCl 和饱和 NaCl 溶液洗涤，干燥并浓缩。粗产物通过硅胶色谱（石油醚/甲基叔丁基醚 5:1）进一步纯化。产量：3.15g N-叔丁氧羰基保护的产物。

b) 消除保护基

通过用三乙酸（10ml）在二氯甲烷（50ml）中消除保护基，并转化为盐酸盐，浓缩，蒸发几次，加入乙醚中的 HCl 后，接着与甲基叔丁基醚/石油醚充分搅拌。产量：2.2g。

实施例 71 和 72

L-苯丙氨酸-1-(3-(4-羟基-3,5-二叔丁基苯基)异噁唑-5-基)乙基酯盐酸盐

a) 消除保护基

3.0g 实施例 70a) 的产物用三氟乙酸（类似于实施例 70b）处理。产量：2.8g 粗产物。

b) 拆分异构体

粗产物通过在 1% 三乙胺存在下用二氯甲烷/甲基叔丁基醚 1:10 硅胶层析几次拆分为非对映异构体。产量：在各种情况下 0.7 - 0.8g 油状产物，下面指定为异构体 A（较高 R_f 值）和 B（较低 R_f 值）。由 HPLC 测定的纯度在各种情况下大于 95%。两种异构体都如实施例 70b) 所述转化为盐酸盐。可以从二氯甲烷/甲基叔丁基醚结晶各种异构体。

实施例 71（异构体 A）： $[\alpha]_D^{20} = +56.1^\circ$ （C = 1，乙醇溶液）

实施例 72（异构体 B）： $[\alpha]_D^{20} = -30.8^\circ$ （C = 1，乙醇溶液）

实施例 73

L-苯丙氨酸-1-(3-(4-羟基-3,5-二叔丁基苯基)-2-异噁唑啉-5-基)乙基酯盐酸盐

a) 用 N-叔丁氧羰基苯丙氨酸酰化

合成根据实施例 70a) 从 3.2g (0.01mol) 实施例 19 的产物

(外消旋赤或异构体)进行。产量: 3.5g N-叔丁氧羰基苯丙氨酸保护的产物。

b) 消除保护基

保护基类似于实施例 70b) 裂解。产量: 2.6g 异构体混合物(归结为外消旋异恶唑啉的使用)。

实施例 74 和 75

L-苯丙氨酸-1-(3-(4-羟基-3,5-二叔丁基苯基)异恶唑啉-5-基)乙基酯盐酸盐

a) 拆分异构体

2.5g 实施例 73a) 的产物通过用石油醚/甲基叔丁基醚 5:1 重复大干胶层析拆分为非对映异构体。产量: 在各种情况下, 0.6-0.7g 油状产物, 下面指定为异构体 A (较高 R_f 值) 和 B (较低 R_f 值)。由 HPLC 测定的纯度在各种情况大于 95%。

b) 消除保护基

两种异构体如实施例 70b) 所述消除保护基并转化为盐酸盐。
实施例 74 (异构体 A): $[\alpha]_D^{20} = +31.6^\circ$ (C = 1, 乙醇溶液)

实施例 75 (异构体 B): $[\alpha]_D^{20} = -59.7^\circ$ (C = 1, 乙醇溶液)

实施例 76

甘氨酸-1-(3-(4-羟基-3,5-二叔丁基苯基)异恶唑啉-5-基)乙基酯盐酸盐

合成根据实施例 70, 从 2.1g (0.012mol) N-BOC-甘氨酸和 3.2g (0.01mol) 实施例 28 的产物进行。消除保护基并转化为盐酸盐之后, 从甲基叔丁基醚/石油醚得到无定形固体产物。产量: 2.6g

实施例 77

甘氨酸-1-(3-(4-羟基-3,5-二叔丁基苯基)-2-异恶唑啉-5-基)乙基酯盐酸盐

合成根据实施例 70, 从 2.1g (0.012mol) N-BOC-甘氨酸

酸和 3.2g (0.01mol) 实施例 19 的产物 (外消旋赤或异构体) 进行。消除保护基并转化为盐酸盐后, 从甲基叔丁基醚/石油醚得到无定形固体产物。产量: 2.3g。

实施例 81

1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异恶唑啉 - 5 - 基) 乙基十六烷酸酯 (赤或异构体)

将 3.2g (0.01mol) 实施例 19 的产物溶于 60ml 四氢呋喃。加入 125mg 4 - 二甲基氨基吡啶和 3.05ml (0.024mol) N - 乙基吗啉后, 在冰冷却下滴加溶于 30ml 四氢呋喃中的 5.5g (0.02mol) 十六烷酰氯; 反应完成后 (用 TLC 监测), 将混合物用水, 硫酸氢钾水溶液和水洗涤, 干燥并浓缩。残留的油状物用石油醚/甲基叔丁基醚硅胶色谱纯化。产量: 1.9g

实施例 82

二 - O - 乙酰基 - L - 酒石酸 - N - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异恶唑 - 5 - 基) 甲基酰胺

4.2g (0.01mol) 实施例 48 的产物与 0.12g 4 - 二甲基氨基吡啶和 4.5ml (0.035mol) N - 乙基吗啉一起首先引入 250ml 四氢呋喃中, 在室温和搅拌下, 0.5 小时内滴加溶于 60ml 四氢呋喃中的 3.3g (0.015mol) (+) - 二 - O - 乙酰基 - L - 酒石酸酐。室温下再过 4 小时后, 加入 50ml 1N HCl, 500ml 水和 500ml 乙酸乙酯; 相分离后, 用水和饱和 NaCl 溶液洗涤后, 接着干燥并浓缩。剩余物用甲基叔丁基醚硅胶层析, 随后从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。产量: 4.9g: $[\alpha]_{D}^{20} = -1.4^{\circ}$ (C = 1, 乙醇溶液)

实施例 83

N - [(3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) 异恶唑 - 5 - 基) 甲基] - L - 酒石酸酰胺

将 1.56g (0.03mol) 实施例 82 的产物溶于 200ml 甲醇中, 加入 0.84g (0.06mol) 磨细的碳酸钾。混合物被搅拌过夜, 用柠檬酸水溶液酸化, 用乙酸乙酯萃取几次。干燥并蒸发浓缩后保留的油状物被结晶。

产量: 1.25g: $[\alpha]_{D}^{20} = +21.5^{\circ}$ (C = 1, 乙醇溶液)

实施例 84

1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异恶唑啉 - 5 - 基) 乙基 3 - 氧代丁酸酯

在冰冷却下, 1.6g 实施例 19 的产物与约 15mg 4 - 二甲基氨基吡啶一起溶于 80ml 无水四氢呋喃中, 并滴加溶于 15ml 四氢呋喃中的 0.46ml (0.006mol) 双烯酮。1 小时后, 将冰浴拿走, 混合物在室温下搅拌过夜。混合物浓缩后, 剩余物在水/乙酸乙酯中处理, 有机相被干燥并浓缩。之后, 从甲基叔丁基醚/石油醚结晶。

产量: 1.05g 浅黄色晶体。

实施例 85

1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异恶唑啉 - 5 - 基) 磷酸二苯基酯

3.2g (0.01mol) 实施例 19 的产物与 0.12g 4 - 二甲基氨基吡啶和 1.4ml (11mmol) N - 乙基吗啉一起溶于 60ml 无水四氢呋喃中, 在室温滴加溶于 10ml 四氢呋喃中的 2.95g (11mmol) 氯化磷酸二苯基酯。4 小时后, 加入柠檬酸水溶液和乙酸乙酯, 有机相被干燥并浓缩, 剩余物被结晶。

产量: 4.7g 晶状产物。

实施例 86 和 87

1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异恶唑啉 - 5 - 基) 乙基 4 - (4 - 吗啉代) 甲基苯甲酸酯盐酸盐, 86: 赤式和 87: 苏式异构体

a) 4 - 氯甲基苯甲酰基丁 - 3 - 烯 - 2 - 基酯

7.2g (0.1mol) 外消旋 1 - 丁烯 - 3 - 醇与 20.5g (0.108mol) 4 - 氯甲基苯甲酰氯, 14g (0.11mol) N - 乙基吗啉和 1.2g 4 - 二甲基氨基吡啶一起在 200ml 无水四氢呋喃中搅拌 24 小时。加入二氯甲烷和柠檬酸水溶液后, 相分离, 有机相用水洗, 干燥并浓缩。用石油醚浸提, 小量沉淀的固体通过过滤除去。浓缩后, 产物被分离为油状物。

b) 反应类似于实施例 1), 从 7.5g (0.03mol) 醛肟和 7.6g (0.034mol) 实施例 86a) 的产物进行。开始为油状物的粗产物通过硅胶色谱 (石油醚/乙酸乙酯 9:1) 进一步纯化。

产量: 3.7g 外消旋赤式/苏式异构体混合物。

c) 与吗啉反应

将 3.6g (7.6mmol) b) 的产物溶于丙酮, 加入 1.3ml (0.015mol) 吗啉和 0.27g (1.6mmol) 碘化钾, 混合物在室温搅拌 2 天。浓缩后, 残余物溶于水/乙酸乙酯中, 有机相用水洗, 干燥并浓缩。4g 产物保持为非对映异构体混合物 (异构体比约为 60:40)。

d) 异构体拆分

将 c) 的粗产物溶于约 200ml 甲基叔丁基醚中, 并加入 8ml 5 摩尔乙醇性盐酸和约 30ml 二氯甲烷。沉淀的盐酸盐被分离并从异丙醇结晶, 赤式非对映异构体首先结晶出来; 此非对映异构体然后通过从异丙醇再结晶富集为非对映异构体比 >95:5。

产量: 0.75g。

也可以通过重复结晶从聚集的母液分离为苏式非对映异构体。

实施例 88

L-酪氨酸基 1 - (3 - (3, 5 - 二叔丁基 - 4 - 羟基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 5 - 基) 乙基酯, 外消旋 5, 5' - 赤式异构体混合物

a) 用 N, O - 二叔丁氧羰基 - L - 酪氨酸酰化

将 7.6g (0.02mol) N, O - 二叔丁氧羰基 - L - 酪氨酸溶于 100ml 无水四氢呋喃, 加入 2.7g (0.02mol) 1 - 羟基苯并三唑和 4.5g (0.022mol) 二环己基碳二亚胺; 混合物然后搅拌约 45 分钟, 沉淀的脲过滤除去。加入 2.3ml (0.018mol) N - 乙基吗啉和 0.24g (0.002mol) 二甲基氨基吡啶后, 滴加溶于 80ml 四氢呋喃中的 4.8g (0.015mol) 实施例 19 的产物。混合物室温搅拌 24 小时后, 通过加入乙酸乙酯处理, 用 0.1N NaOH 和 0.1N HCl

和饱和 NaCl 溶液洗涤，干燥并浓缩。粗产物用硅胶色谱（甲基叔丁基醚/石油醚）进一步纯化。产量：10.5 N-叔丁氧羰基保护的产物油状物。

b) 消除保护基

类似于实施例 70b) 消除保护基。碱被释放后，通过硅胶色谱（甲基叔丁基醚/二氯甲烷/甲醇，10:9:1）进一步纯化。

产量：1.6g 无定形固体。

实施例 89

3 - (3, 5 - 二叔丁基 - 4 - 羟基苯基) - 5 - (1, 2 - 二羟基乙基) - 2 - 并噁唑啉，外消旋赤式异构体

将 2.9g 实施例 16 的产物溶于 50ml 二恶烷和 10ml 水中，然后加入 0.75ml 70% 高氯酸水溶液，混合物在室温搅拌 18 小时。加入 20ml 5% 碳酸钠水溶液和 150ml 水后，混合物用乙酸乙酯重复萃取，有机相被洗涤，干燥并浓缩。通过从甲基叔丁基醚/石油醚结晶以纯的形式得到产物。

产量：1.3g。

实施例 90

3 - (3, 5 - 二叔丁基 - 4 - 羟基苯基) - 5 - (1, 2 - 二羟基乙基) - 2 - 异噁唑啉，外消旋苏式异构体

类似于实施例 89，从 2.4g 实施例 17 的产物完成。

产量：1.25g 晶状产物。

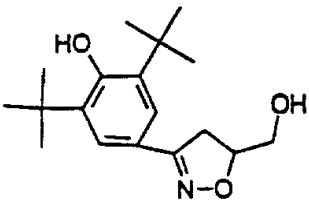
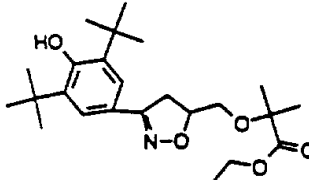
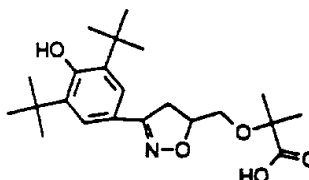
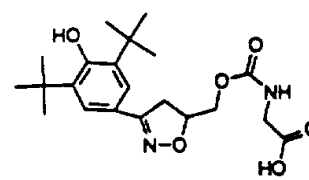
实施例 91

1 - (3 - (4 - 羟基 - 3, 5 - 二叔丁基苯基) - 2 - 异噁唑啉 - 5 - 基)乙基 4 - (4 - 甲基哌嗪 - 1 - 基)甲基苯甲酸酯二氢溴酸盐，赤式异构体)

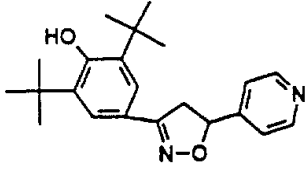
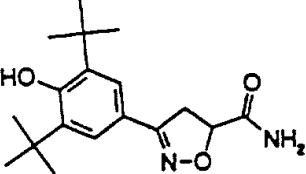
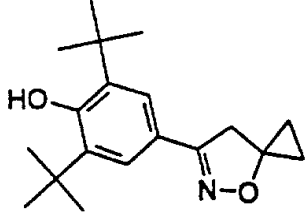
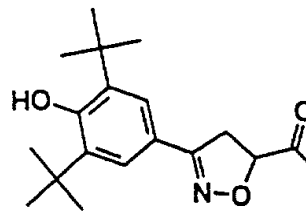
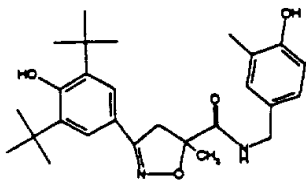
类似于实施例 86 完成。非对映异构体在步骤 b) 通过分级结晶富集。在步骤 c)，N-甲基哌嗪被用于代替吗啉。氢溴酸盐沉淀后，在步骤 d) 的异构体富集 >95%。

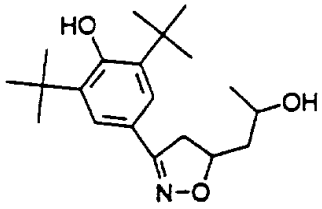
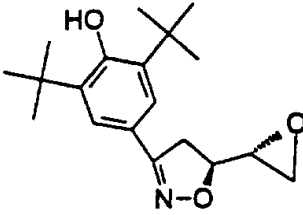
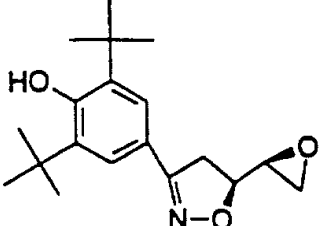
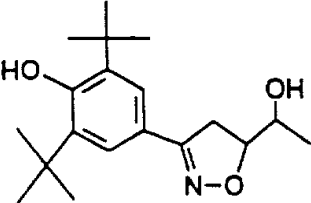
产量：1.9g 赤式产物，从 4.7g 步骤 b) 产物得到。

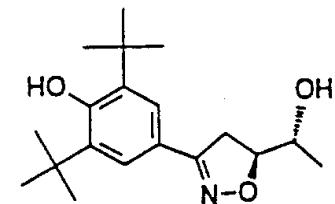
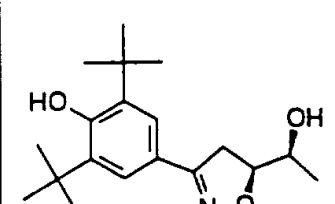
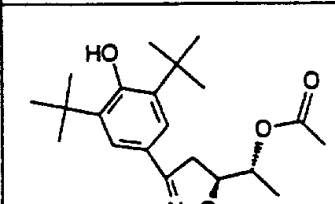
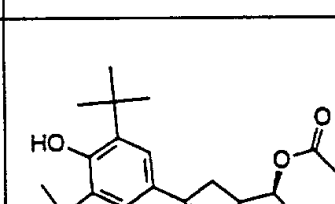
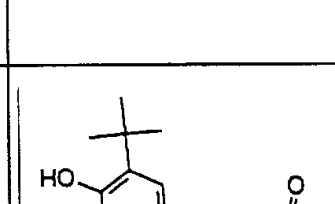
表 1

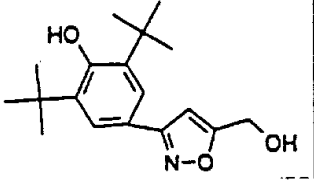
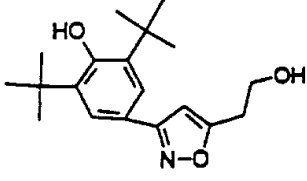
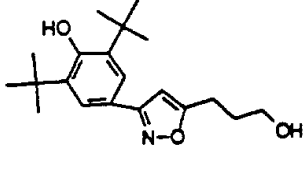
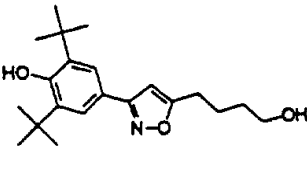
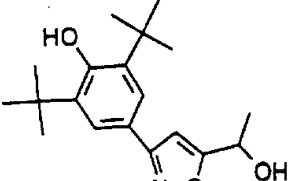
实施例	结构	溶剂	^1H NMR	M.p. ($^{\circ}\text{C}$)
1		CDCl_3	1.45 (s, 18H) 2.05 (tb, 1H) 3.16-3.45 (m, 2H) 3.55-3.95 (m, 2H) 4.83 (m, 1H) 5.49 (s, 1H) 7.5 (s, 2H)	132-135
2		CDCl_3	1.26 (t, 3H) 1.43-1.46 (sb, 24H) 3.3-3.68 (m, 4H) 4.18 (q, 2H) 4.86 (m, 1H) 5.49 (s, 1H) 7.52 (s, 2H)	86-88
3		CDCl_3	1.46 (s, 18H) 1.48 and 1.50 (在各种情况 s, 3H) 3.15-3.52 (m, 2H) 3.61 (d, 2H) 4.89 (m, 1H) 5.50 (s, 1H) 7.50 (s, 2H)	183-186
4		CDCl_3	1.39 (s, 18H) 3.05-3.70 (m, 4H) 3.95-4.19 (m, 2H) 4.82 (m, 1H) 7.40 (s, 2H) 7.58 (tb, 1H)	124-132

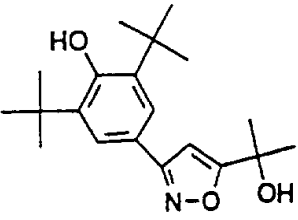
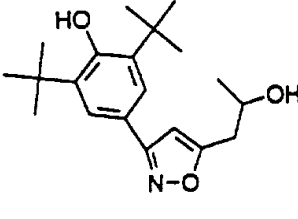
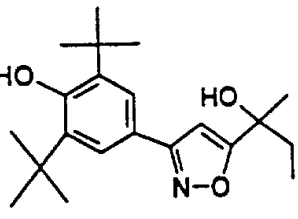
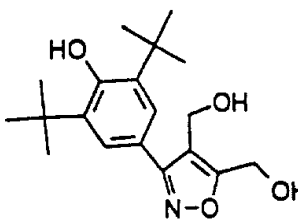
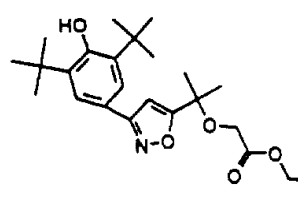
5		CDCl ₃	1.45 (s, 18H) 3.58-3.78 (m, 2H) 3.82-3.95 (2d, 在各种情况 3H) 4.88 (m, 1H) 5.52 (sb, 2H) 7.50 (s, 2H)	196
6		DMSO-d6	1.39 (s, 18H) 3.25-3.85 (m, 2H) 4.62 (m, 1H) 7.39 (s, 2H) 11.0 (sb, 2H)	214 (分解)
7		DMSO-d6	1.39 (s, 18H) 3.25-3.95 (m, 5H, incl. d, 3H at 3.65) 4.76 (m, 1H) 7.40 (s, 2H) 7.48 (sb, 1H)	183-186 (分解)
8		DMSO-d6	1.39 (s, 18H) 3.34-3.86 (m, 2H) 5.70 (m, 1H) 7.13 (m, 1H) 7.40-7.58 (m, 4H)	121-125
9		DMSO-d6	1.39 (s, 18H) 3.59-3.94 (m, 2H) 5.72 (m, 1H) 7.30-7.55 (m, 5H) 7.82 (m, 1H) 8.57 (m, 1H)	149- 150

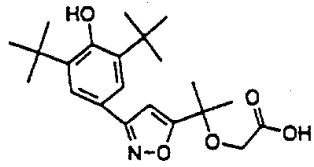
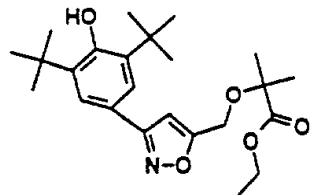
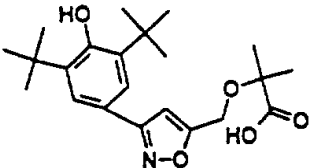
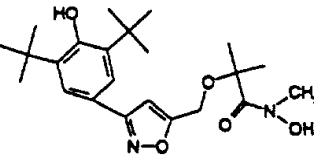
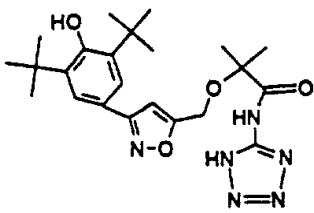
10		DMSO-d6	1.39 (s, 18H) 3.29-3.44 and 3.82-4.0 (在各种 情况 m, 1H) 5.73 (m, 1H) 7.35-7.47 (m, 5H) 8.57 (m, 2H)	179-180
11		DMSO-d6	1.39 (s, 18H) 3.40-3.75 (m, 2H) 4.99 (m, 1H) 7.41 (s, 2H) 7.44 (sb, 1H) 7.60 (sb, 1H)	258-262
12		CDCl ₃	0.81 (m, 2H) 1.21 (m, 2H) 1.46 (s, 18H) 3.41 (s, 2H) 5.47 (s, 1H) 7.50 (s, 2H)	149-151
13		CDCl ₃	1.40 (s, 18H) 2.31 (s, 3H) 3.35-3.64 (m, 2H) 4.94 (m, 1H) 5.47 (s, 1H) 7.45 (s, 2H)	94
14		CDCl ₃	1.44 (s, 18H) 1.74 (s, 3H) 2.18 (s, 6H) 3.24 (d, 1H) 3.88 (d, 1H) 4.14-4.43 (m, 2H) 4.70 (s, 1H) 5.52 (s, 1H) 6.84 (s, 2H) 7.13 (tb, 1H) 7.47 (s, 2H)	194

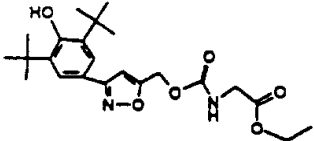
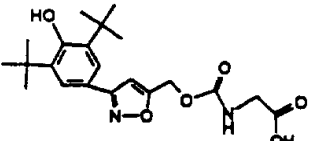
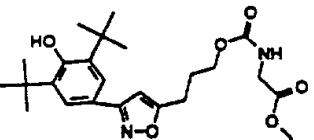
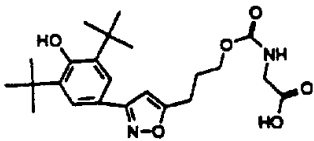
15		CDCl ₃	1.34-1.28 (2d, 3H) 1.45 (s, 18H) 1.58-2.04 (m, 3H) 2.93-3.10 and 3.38-3.58 (在各种情况 m, 1H) 4.12 and 4.90 (在各种情况 m, 1H) 5.47 and 5.48 (在各种情况 s, 0.5H) 7.49 and 7.50 (在各种情况 s, 1H)	131-133
16		CDCl ₃	1.46 (s, 18H) 2.72, 2.89 and 3.16 (在各种情况 m, 1H) 3.21-3.52 (m, 2H) 4.61 (m, 1H) 5.50 (s, 1H) 7.51 (s, 2H)	148-153
17		CDCl ₃	1.45 (s, 18H) 2.84 (d, 2H) 3.18-3.57 (m, 3H) 4.73 (m, 1H) 5.48 (s, 1H) 7.49 (s, 2H)	123-126
18		DMSO-d ₆	1.06-1.11 (2d, 3H) 1.40 (s, 18H) 3.08-3.43 (m, 2H) 3.52-3.80 (m, 1H) 4.31-4.55 (m, 1H) 4.81-4.96 (2db, 1H, OH) 7.36 (sb, 1H) 7.40 and 7.41 (在各种情况 s, 1H)	126-146

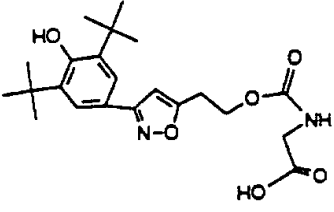
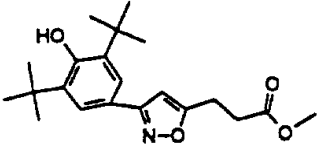
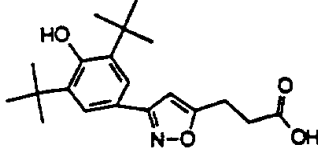
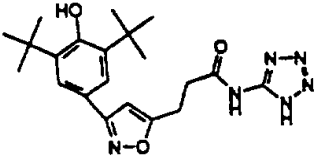
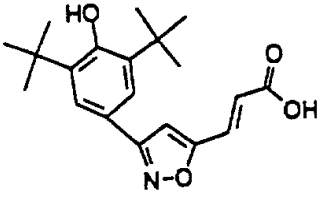
19		DMSO-d6	1.07 (d, 3H) 1.39 (s, 18H) 3.15-3.41. (m, 3H) 3.62 (m, 1H) 4.38 (m, 1H) 4.90 (d, 1H) 7.38 (s, 2H)	161
20		DMSO-d6	1.07 (d, 3H) 1.38 (s, 18H) 3.05-3.45 (m, 3H) 3.66 (m, 1H) 4.44 (m, 1H) 4.85 (d, 1H) 7.38 (s, 2H)	134-135
21		CDCl3	1.30 (d, 3H) 1.46 (s, 18H) 2.07 (s, 3H) 3.05-3.50 (m, 2H) 4.72 (m, 1H) 5.07 (m, 1H) 5.48 (s, 1H) 7.49 (s, 2H)	149-151
22		CDCl3	1.32 (d, 3H) 1.46 (s, 18H) 2.06 (s, 3H) 3.02-3.48 (m, 2H) 4.73 (m, 1H) 5.09 (m, 1H) 5.48 (s, 1H) 7.49 (s, 2H)	128-130
23		MeOH-d4	1.44 (s, 18H) 3.50-3.85 (m, 2H) 4.93 (sb, 酸 H) 5.13 (m, 1H) 7.50 (s, 2H)	176-178 (分解)

24		MeOH-d4	1.47 (s, 18H) 4.70 (s, 2H) 4.88 (sb, 酸 H) 6.67 (s, 1H) 7.62 (s, 2H)	149-155
25		DMSO-d6	1.42 (s, 18H) 2.92 (t, 2H) 3.75 (m, 2H) 4.90 (tb, 1H) 6.72 (s, 1H) 7.33 (sb, 1H) 7.54 (s, 2H)	125
26		CDCl3	1.48 (s, 18H) 2.02 (m, 2H) 2.91 (t, 2H) 3.75 (t, 2H) 5.43 (s, 1H) 6.26 (s, 1H) 7.59 (s, 2H)	133-135
27		DMSO-d6	1.3-1.59 (m, 20H) 1.71 (m, 2H) 2.77 (t, 2H) 3.41 (m, 2H) 4.45 (tb, 1H) 6.71 (s, 1H) 7.35 (sb, 1H) 7.54 (s, 2H)	82
28		DMSO-d6	1.36-1.53 (s, 18H and d, 3H) 4.89 (m, 1H) 5.75 (db, 1H) 6.79 (s, 1H) 7.38 (sb, 1H) 7.56 (s, 2H)	123-124

29		DMSO-d6	1.43 (s, 18H) 1.52 (s, 6H) 5.62 (sb, 1H) 6.74 (s, 1H) 7.36 (sb, 1H) 7.55 (s, 2H)	142
30		CDCl3	1.32 (d, 3H) 1.48 (s, 18H) 1.80 (db, 1H) 2.95 (d, 2H) 4.24 (m, 1H) 5.44 (s, 1H) 6.36 (s, 1H) 7.60 (s, 2H)	125-132
31		DMSO-d6	0.82 (t, 3H) 1.44 (s, 18H) 1.48 (s, 3H) 1.80 (q, 2H) 5.50 (sb, 1H) 6.74 (s, 1H) 7.35 (sb, 1H) 7.57 (s, 2H)	150-151
32		DMSO-d6	1.43 (s, 18H) 4.41 and 4.63 (in 在各种情况 d, 2H) 5.11 and 5.52 (in each case tb, 1H) 7.34 (sb, 1H) 7.66 (s, 2H)	191-195 (分解)
33		CDCl3	1.33 (t, 3H) 1.45 (s, 18H) 1.68 (s, 6H) 2.19 (sb, 1H) 4.32 (q, 2H) 4.37 (s, 2H) 6.43 (s, 1H) 7.67 (s, 2H)	124

34		DMSO-d6	1.42 (s, 18H) 1.53 (s, 6H) 4.30 (s, 2H) 5.65 (sb, 1H) 6.91 (s, 1H) 7.72 (s, 2H) 13.1 (sb, 1H)	209- 210
35		CDCl ₃	1.30 (t, 3H) 1.47 (s, 18H) 1.53 (s, 6H) 4.23 (q, 2H) 4.65 (s, 2H) 5.48 (s, 1H) 6.54 (s, 1H) 7.61 (s, 2H)	67-68
36		CDCl ₃	1.48 (s, 18H) 1.59 (s, 6H) 4.70 (s, 2H) 5.45 (sb, 1H) 6.54 (s, 1H) 7.61 (s, 2H)	182- 185
37		CDCl ₃	1.48 (s, 18H) 1.59 (s, 6H) 3.60 (sb, 3H) 4.53 (sb, 2H) 5.47 (sb, 1H) 6.50 (s, 1H) 7.60 (s, 2H) 8.50 (sb, 1H)	107- 113
38		DMSO-d6	1.43 (s, 18H) 1.54 (s, 6H) 4.69 (sb, 2H) 6.99 (s, 1H) 7.41 (sb, 1H) 7.56 (s, 2H) 11.80 (sb, 1H)	247- 249 (分解)

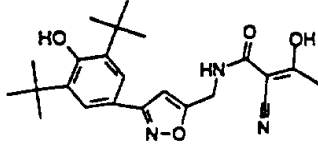
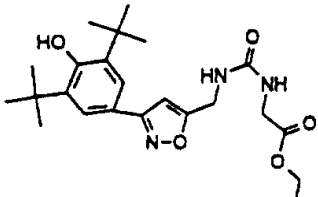
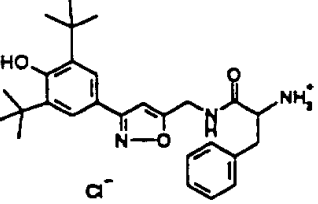
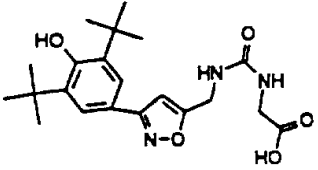
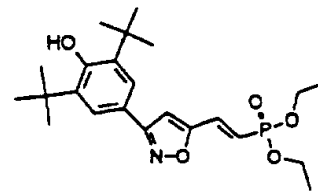
39		CDCl ₃	1.28 (t, 3H) 1.47 (s, 18H) 3.98 (d, 2H) 4.21 (q, 2H) 5.23 (sb, 2H) 5.40 (tb, 1H) 5.46 (s, 1H) 6.58 (s, 1H) 7.60 (s, 2H)	(油)
40		DMSO-d ₆	1.43 (s, 18H) 3.40 (sb, 2H) 3.71 (d, 2H) 5.20 (sb, 2H) 6.99 (s, 1H) 7.56 (s, 2H) 7.80 (tb, 1H) 12.65 (sb, 1H)	185- 188
41		CDCl ₃	1.29 (t, 3H) 1.48 (s, 18H) 2.10 (m, 2H) 2.88 (t, 2H) 3.98 (d, 2H) 4.11-4.30 (m, 4H) 5.20 (tb, 1H) 5.44 (s, 1H) 6.27 (s, 1H) 7.59 (s, 2H)	86
42		DMSO-d ₆	1.43 (s, 18H) 1.99 (m, 2H) 2.82 (tb, 2H) 3.67 (d, 2H) 4.06 (tb, 2H) 6.77 (s, 1H) 7.33 (sb, 1H) 7.45 (tb, 1H) 7.55 (s, 2H) 12.55 (sb, 1H)	201- 203

43		DMSO-d6	1.42 (s, 18H) 3.10 (tb, 2H) 3.63 (d, 2H) 4.29 (tb, 2H) 6.80 (s, 1H) 7.35 (sb, 1H) 7.54 (s, 2H and tb, 1H) 12.55 (sb, 1H)	152- 155
44		CDCl ₃	1.48 (s, 18H) 2.79 and 3.12 (在各种情况 t, 2H) 3.71 (s, 3H) 5.43 (s, 1H) 6.28 (s, 1H) 7.58 (s, 2H)	89
45		DMSO-d6	1.42 (s, 18H) 2.71 and 2.99 (在各种情况 t, 2H) 6.75 (s, 1H) 7.35 (sb, 1H) 7.54 (s, 2H) 12.4 (sb, 1H)	188
46		DMSO-d6	1.43 (s, 18H) 2.95 and 3.15 (在各种情况 tb, 2H) 6.75 (s, 1H) 7.38 (s, 1H) 7.54 (s, 2H) 12.2 (sb, 1H)	249 (分解)
47		DMSO-d6	1.44 (s, 18H) 6.65 and 7.51 (在各种情况 d, 1H) 7.49 (s, 1H) 7.60 (s, 2H) 13.0 (sb, 1H)	206- 208

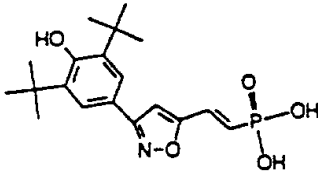
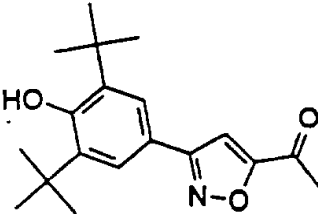
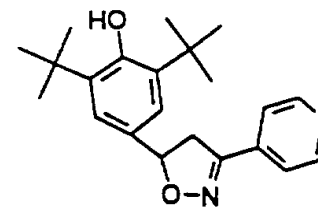
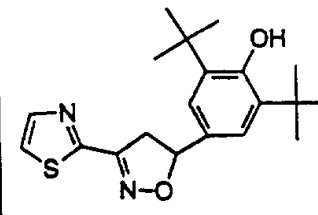
5

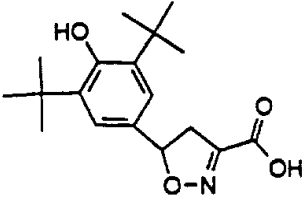
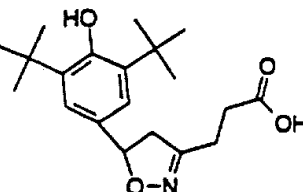
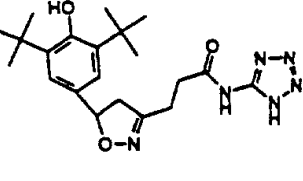
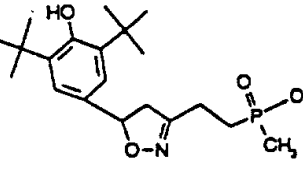
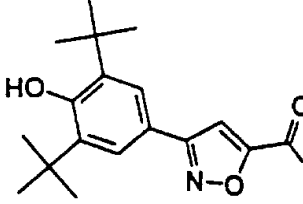
48		DMSO-d6	1.43 (s, 18H) 4.33 (s, 2H) 7.06 (s, 1H) 7.52 (sb, 1H) 7.55 (s, 2H) 8.65 (sb, 酸 H)	194
49		CDCl3	1.48 (s, 18H) 4.60 (s, 2H) 5.51 (s, 1H) 6.55 (s, 1H) 7.58 (s, 2H)	163-165
50		CDCl3	1.35-1.50 (s, 18H and t, 3H) 4.38 (q, 2H) 4.69 (d, 2H) 5.46 (s, 1H) 6.49 (s, 1H) 7.55 (s and tb, 3H)	124-126
51		DMSO-d6	1.41 (s, 18H) 4.48 (d, 2H) 6.81 (s, 1H) 7.40 (sb, 1H) 7.55 (s, 2H) 9.50 (tb, 1H) 13.7 (sb, 1H)	165 (分解)
52		CDCl3	1.46 (s, 18H) 2.73 (s, 3H) 4.72 (d, 2H) 5.47 (s, 1H) 6.51 (s, 1H and tb, 1H) 7.57 (s, 2H) 8.41 (s, 1H)	146-148

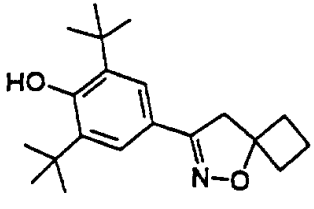
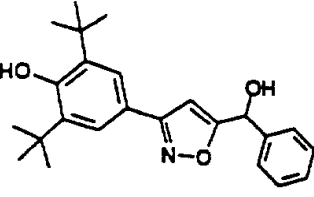
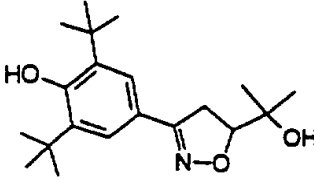
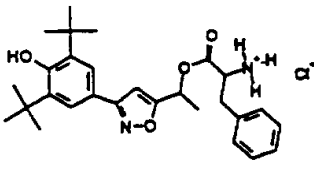
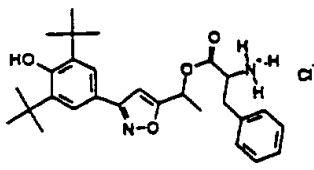
5

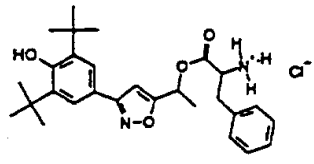
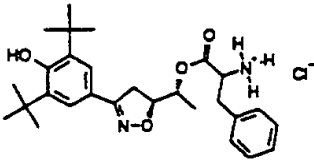
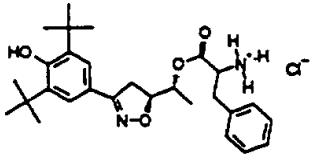
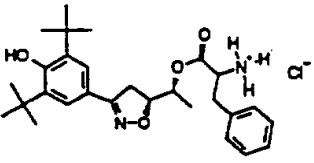
53		CDCl ₃	1.47 (s, 18H) 2.31 (s, 3H) 4.67 (d, 2H) 5.46 (s, 1H) 6.46 (s, 1H) 6.51 (tb, 1H) 7.58 (s, 2H) 15.3 (sb, 1H)	178-180
54		CDCl ₃	1.25 (t, 3H) 1.46 (s, 18H) 4.0 (d, 2H) 4.18 (q, 2H) 4.54 (d, 2H) 5.38 (tb, 1H) 5.45 (s, 1H) 5.54 (tb, 1H) 6.47 (s, 1H) 7.57 (s, 2H)	145-150
55		DMSO-d ₆	1.44 (s, 18H) 3.0-3.22 (m, 2H) 4.07 (tb, 1H) 4.45 (db, 2H) 6.75 (s, 1H) 7.15-7.35 (m, 5H) 7.54 (s, 2H) 8.05 (sb, 酸 H) 9.35 (tb, 1H)	98-138 (无定形)
56		DMSO-d ₆	1.42 (s, 18H) 3.73 (d, 2H) 4.37 (d, 2H) 6.40 (tb, 1H) 6.68 (s, 1H) 6.85 (tb, 1H) 7.40 (sb, 1H) 7.53 (s, 2H)	159-165
57		DMSO-d ₆	1.29 (t, 6H) 1.43 (s, 18H) 4.0-4.15 (m, 2H) 6.75 (t, 1H) 7.35 (dd, 1H) 7.47 (d, 1H) 7.59 (s, 2H)	119-125

5

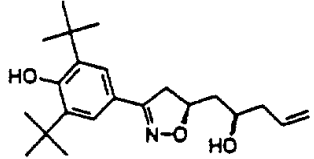
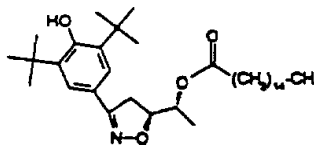
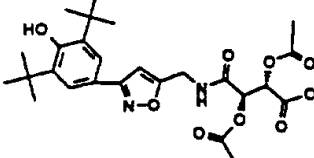
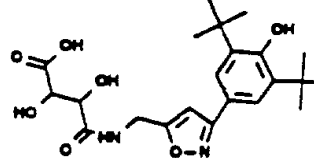
58		DMSO-d6	1.44 (s, 18H) 6.68 (dd, 1H) 7.15 (dd, 1H) 7.39 (s, 1H) 7.60 (s, 2H) 9.3-10.0 (sb, 酸 H)	247-249 (分解)
59		CDCl ₃	1.49 (s, 18H) 2.65 (s, 3H) 5.53 (s, 1H) 7.17 (s, 1H) 7.64 (s, 2H)	161-162
60		CDCl ₃	1.44 (s, 18H) 3.25-3.41 and 3.60-3.75 (在 各种情况 m, 1H) 5.31 (s, 1H) 5.71 (m, 1H) 7.17 (s, 2H) 7.57 and 8.70 (在 各种情况 m, 2H)	191-193
61		DMSO-d6	1.39 (s, 18H) 3.35-3.55 and 3.81-3.99 (在 各种情况 m, 1H) 5.73 (m, 1H) 7.11 (s, 1H) 7.16 (s, 2H) 7.92 and 8.02 (在 各种情况 d, 2H)	89-91

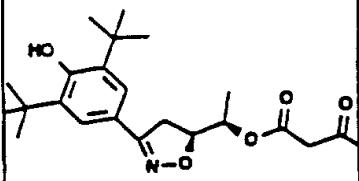
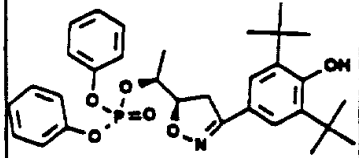
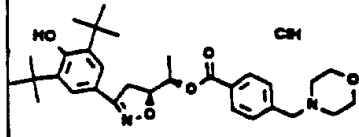
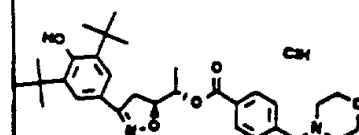
62		CDCl ₃	1.44 (s, 18H) 3.17-3.33 and 3.51-3.67 (在各种情况 m, 1H) 5.33 (sb, 1H) 5.78 (m, 1H) 7.13 (s, 2H) 6.7-7.5 (sb, 酸 H)	151-153
63		CDCl ₃	1.43 (s, 18H) 2.60-2.82 (m, 4H) 2.90-3.05 and 3.20-3.38 (在各种情况 m, 1H) 5.25 (sb, 1H) 5.49 (m, 1H) 7.13 (s, 2H) 6.1-7.6 (sb, 酸 H)	171-174
64		CDCl ₃	1.20 (s, 18H) 2.47-2.88 (m, 5H) 3.06-3.25 (m, 1H) 4.25 (sb, 酸 H) 5.28 (m, 1H) 6.89 (s, 2H)	220-224
65		CDCl ₃	1.43 (s, 18H) 1.53 (d, 3H) 2.0-2.21 (m, 2H) 2.55-2.79 (m, 2H) 2.90-3.05 and 3.20-3.39 (在各种情况 m, 1H) 5.35 (sb, acid H) 5.48 (m, 1H) 7.13 (s, 2H)	182-184 (分解)
66		CDCl ₃	1.49 (s, 18H) 5.54 (s, 1H) 7.25 (s, 2H) 10.02 (s, 1H)	127

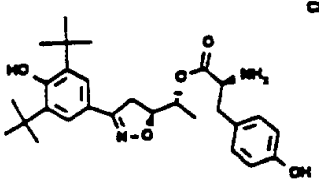
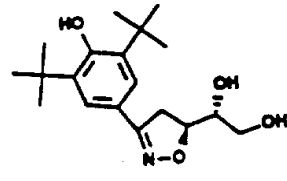
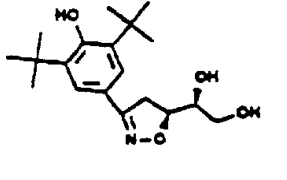
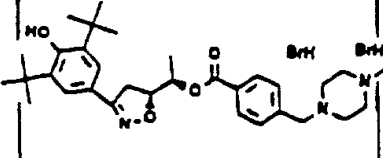
67		CDCl_3	1.35-1.95 (m, 2H and s, 18H) 2.1-2.3 (m, 2H) 2.45-2.67 (m, 2H) 3.39 (s, 2H) 5.46 (s, 1H) 7.49 (s, 2H)	121-122
68		CDCl_3	1.47 (s, 18H) 2.8 (sb, 1H) 5.45 (sb, 1H) 5.95 (s, 1H) 6.44 (s, 1H) 7.3-7.5 (m, 5H) 7.59 (s, 2H)	140
69		CDCl_3	1.23 and 1.35 (在各种情况 s, 3H) 1.45 (s, 18H) 2.06 (sb, 1H) 3.15-3.43 (m, 2H) 4.53 (m, 1H) 5.48 (sb, 1H) 7.50 (s, 2H)	139
70		DMSO-d_6	1.3-1.65 (2s, 18H and 2d, 3H) 2.95-3.3 (m, 2H) 4.42 (tb, 1H) 5.9-6.13 (m, 1H) 6.98 and 7.02 (2s, 1H) 7.1-7.55 (m, 5H and 2s, 2H) 8.4 (sb, 3H)	105-125 (分解)
5 71		DMSO-d_6	1.3-1.45 (s, 18H and d, 3H) 3.04-3.3 (m, 2H) 4.38 (tb, 1H) 5.93-6.08 (m, 1H) 7.11 (s, 1H) 7.28-7.41 (m, 5H) 7.56 (s, 2H) 8.4 (sb, 3H)	105-115 (分解)

72		DMSO-d6	1.43 (s, 18H) 1.63 (d, 3H) 3.0-3.25 (m, 2H) 4.41 (tb, 1H) 6.05-6.14 (m, 1H) 7.0 (s, 1H) 7.1-7.28 (m, 5H) 7.56 (s, 2H) 8.72 (sb, 3H)	190
73		DMSO-d6	1.02 and 1.23 (在各种情况 d, 1.5H) 1.35 and 1.40 (在各种情况 s, 9H) 2.85-3.57 (m, 4H) 4.1-4.3 (m, 1H) 4.54-4.78 (m, 1H) 4.95-5.15 (m, 1H) 7.1-7.48 (m, 5H and 2d, 在各种情况 1H) 8.55 (sb, 3H)	210-215
74		DMSO-d6	1.02 (d, 3H) 1.40 (s, 18H) 2.90-3.50 (m, 4H) 4.1-4.25 (m, 1H) 4.58-4.73 (m, 1H) 4.90-5.04 (m, 1H) 7.1-7.31 (m, 5H) 7.37 (s, 2H) 8.79 (sb, 3H)	207
75		DMSO-d6	1.23 (d, 3H) 1.35 (s, 18H) 2.95-3.06 (d, 2H) 3.20-3.57 (m, 2H) 4.25 (t, 1H) 4.63-4.78 (m, 1H) 5.08-5.15 (m, 1H) 7.1-7.3 (m, 5H) 7.38 (s, 2H) 8.40 (sb, 3H)	193

76		DMSO-d ₆	1.43 (s, 18H) 1.66 (d, 3H) 3.93 (sb, 2H) 6.13 (q, 1H) 7.17 (s, 1H) 7.45 (sb, 1H) 7.57 (s, 2H) 8.60 (sb, 3H)	70-85 (分解)
77		DMSO-d ₆	1.23 (d, 3H) 1.40 (s, 18H) 3.22-3.90 (m, 4H) 4.65-4.85 (m, 1H) 5.0-5.18 (m, 1H) 7.40 (s, 2H) 7.47 (sb, 1H) 8.40 (sb, 3H)	90-110 (分解)
78		CDCl ₃	1.22 (d, 3H) 1.45 (s, 18H) 1.50-2.05 (m, 4H) 2.97-3.12 and 3.40-3.57 (在各种情况 m, 1H) 3.2-3.8 (sb, 2H) 4.0-4.28 (m, 2H) 4.82-5.02 (m, 1H) 5.50 (s, 1H) 7.49 (s, 2H)	144-145
79		CDCl ₃	1.45 (s, 18H) 1.50-2.0 (m, 2H) 2.2-2.35 (m, 2H) 2.6 (sb, 1H) 3.07-3.16 and 3.40-3.56 (在各种情况 m, 1H) 3.85-4.05 (m, 1H) 4.8-5.0 (m, 1H) 5.08-5.23 (m, 2H) 5.50 (s, 1H) 5.7-5.95 (m, 1H) 7.49 (s, 2H)	103-105

80		CDCl ₃	1.45 (s, 18H) 1.55-2.45 (m, 5H) 2.95-3.10 and 3.40-3.56 (在各种情况 m, 1H) 3.91-4.05 (m, 1H) 4.87-5.05 (m, 1H) 5.08-5.23 (m, 2H) 5.48 (s, 1H) 5.7-5.95 (m, 1H) 7.49 (s, 2H)	115-118
81		CDCl ₃	0.88 (t, 3H) 1.15-1.7 (m, 27H and s, 18H at 1.46) 2.3 (t, 2H) 3.05-3.25 and 3.3-3.47 (在各种 情况 m, 1H) 4.6-4.75 (m, 1H) 4.98-5.12 (m, 1H) 5.48 (s, 1H) 7.48 (s, 2H)	油
82		CDCl ₃	1.47 (s, 18H) 2.06 and 2.21 (在各种情况 s, 3H) 4.45-4.81 (m, 2H) 5.48 (sb, 1H) 5.64 and 5.83 (在各种情况 d, 2H) 6.49 (s, 1H) 6.85 (t, 1H) 7.56 (s, 2H)	88-92 (分解)
83		DMSO-d ₆	1.43 (s, 18H) 4.30-4.51 (m, 4H) 6.69 (s, 1H) 7.39 (sb, 1H) 7.52 (s, 2H) 8.48 (tb, 1H)	125-154

84		CDCl_3	1.34 (d, 3H) 1.46 (s, 9H) 2.25 (s, 3H) 3.13-3.49 (m, 2H) 3.45 (s, 2H) 4.62-4.77 (m, 1H) 5.03-5.18 (m, 1H) 5.49 (sb, 1H) 7.49 (s, 2H)	102
85		DMSO-d6	1.31 (d, 3H) 1.40 (s, 18H) 3.18-3.60 (m, 2H) 4.69-4.95 (m, 2H) 7.13-7.48 (m, 12H)	118
86		DMSO-d6	1.32 (d, 3H) 1.38 (s, 18H) 2.95-3.98 (m, 10H) 4.38 (sb, 2H) 4.76-4.91 (m, 1H) 5.19-5.28 (m, 1H) 7.40 (s, 2H) 7.43 (sb, 1H) 7.73 (d, 2H) 7.94 (d, 2H) 11.79 (sb, 1H)	241-243 (分解)
87		DMSO-d6	1.32-1.45 (d, 3H and s, 18H) 2.95-4.00 (m, 10H) 4.40 (db, 2H) 4.74-4.91 (m, 1H) 5.09-5.23 (m, 1H) 7.41 (s, 2H) 7.43 (sb, 1H) 7.76 (d, 2H) 8.00 (d, 2H) 11.50 (sb, 1H)	248-255 (分解)

88		CDCl ₃	1.25 and 1.30 (在各种情况 ^d , 1.5H) 1.41 and 1.44 (在各种情况 ^s , 9H) 2.65-3.71 (m, 5H) 4.65-4.82 (m, 1H) 5.04-5.22 (m, 1H) 5.49 (sb, 1H) 6.55-6.68 (m, 2H) 6.85-6.97 (m, 2H) 7.47 and 7.49 (在各种情况 ^s , 1H)	110-135
89		DMSO-d ₆	1.41 (s, 9H) 3.26-3.63 (m, 5H) 4.52-4.71 (m, 1H and sb, 1H) 5.02 (d, 1H) 7.37 (s, 1H) 7.41 (s, 2H)	155
90		DMSO-d ₆	1.40 (s, 9H) 3.14-3.52 (m, 5H) 4.56-4.72 (m, 2H) 4.85 (d, 1H) 7.36 (s, 1H) 7.39 (s, 2H)	129
91		DMSO-d ₆	1.32 (d, 3H) 1.41 (s, 18H) 2.87 (sb, 3H) 3.10-3.68 (m, 10H) 4.27 (sb, 2H) 4.79-4.92 (m, 1H) 5.21-5.33 (m, 1H) 7.45 (s, 2H) 7.47 (sb, 1H) 7.61 (d, 2H) 7.96 (d, 2H) 10.0 (sb, 1H)	195-198

药理试验

为了表征其有价值的抗炎，抗气喘和免疫调节性质，和高耐量程度，式 I 化合物在下列实验性试验中被检验，这些试验被认为特别适于评估这类具有抗风湿活性的化合物作用的质量。

从人的外周血分离多晶核白细胞 (PMNL) 以进行试验 1 和 2 , 10ml 人血用 10ml HBSS (Serva) 稀释, 并用 15ml Lymphoprep (Dr, Molter GmbH, Heidelberg) 铺垫。样品然后在 $400 \times g$ (每分钟 1600 转, Minifuge 2, Heraeus, Osterode) 离心分离 25 分钟。这导致了形成三相: 最上层由血浆和血小板组成, 中间相是 Lymphoprep。由单核细胞组成的白色环存在于两相之间。最下层相由红细胞组成, 它被一 PMNL 白色层覆盖。最上层相, 以及 Lymphoprep 和白色环用注射器小心地除去。保留的沉积物被小心地再分散于 15ml 在 PM16 (mw: 485000, Sigma, Deisenhofen) 中的 3% 葡聚糖中。悬浮液然后在室温放置 1 小时。在此期间, 红细胞沉积下来而 PMNL 保留在上层清液中。除去上层清液, 用约等体积的 PM16 稀释, 在 $400 \times g$ 离心分离 15 分钟。如果 PMNL 沉积物被细胞严重沾污, 则需要进行低渗溶解。为此, 沉积物再悬浮于 750 μ l 水中。恰好 15 秒之后, 悬浮液用约 7ml PM16 稀释, 在 $400 \times g$ 离心分离 10 分钟。如果需要, 这一溶解再重复一次。按另一方法, 将 PMNL 沉积物再悬浮于合适介质中。

试验 1, 释放解蛋白活性

250 μ l PMNL ($5 \cdot 10^6$ 个细胞/ml 含 7.5mM 葡萄糖的 PBS) 在 37 $^{\circ}$ C 与 1 μ l 试验物质培养 20 分钟。然后加入 1 μ l 细胞松弛素 B (5 μ g/ml 试验混合物)、混合物在 37 $^{\circ}$ C 再培养 5 分钟。加入 1 μ l 组织坏死因子 α (TNF, 30ng/ml 试验混合物) 之后, 继续培养 5 分钟。释放在 1 μ l fMLP (10nmol/l 试验混合物) 开始。在 37 $^{\circ}$ C 60 分钟之后, 反应通过将样品冷却至低于 0 $^{\circ}$ C 而终止。然后将样品离心分离, 上层清液被除去并冷冻。细胞松弛素 B 和 fMLP 被溶于 DMSO, 而 TNF 用缓冲液稀释。50 μ l 上层清液与 175 μ l 缓冲溶液 (100nM HEPES, pH7.5; 500mM NaCl) 在 96 - 孔微量滴定板中

混合。加入 25 μ l 底物 (甲氧基丁二酰基 - L - Ala - L - Ala - L - Pro - L - Val - 对硝基苯胺) , 在 0 , 5 , 10 , 15 , 30 和 60 分钟后, 在 405nm 测量各孔的消光。

试验 2, 氧基的释放

PMNL 被再悬浮 ($5 \cdot 10^6$ 个细胞/ml) 于 Dulbecco's PBS 中, 补充 7.5mM 葡糖。应小心地确保 PMNL 不含红细胞。100 μ l PMNL, 700 μ l PBS + 葡糖和 100 μ l 细胞色素 C (9.38mg/ml PBS + 葡糖) 在半微池中混合。100 μ l PMNL, 500 μ l PBS + 葡糖, 100 μ l 细胞松弛素 B ($1 \cdot 10^{-6}$ mol) , 100 μ l TNF (0.05ng) 和 100 μ l 细胞色素 C (9.38mg/ml PBS + 葡糖) 被混合用于 fMLP - 诱导的氧释放。在双光束光度计 (Perkin - Elmer 552 S) 中在 550nm 波长测量。测量范围为 0 - 1 消光单位。小池被温度平衡至 37 $^{\circ}$ C。参考小池还含 10 μ l SOD (6mg SOD/ml PBS + 葡糖)。预培养 5 分钟后, 反应用 100 μ l 诱导剂开始。反应用 $1 \cdot 10^{-7}$ mol fMLP 开始。

试验 3, 由白血细胞形成 LTB₄

白血细胞的分离:

40ml 人血与 8ml 6% 葡聚糖溶液 (葡聚糖 mw: 480000 在 PM16 中) 混合。室温下 1 小时后, 由白血细胞组成的上层清液被除去, 用等体积 PM16 稀释, 在 $300 \times g$ (1600rpm) 离心分离 15 分钟。沉积物随后再悬浮于约 5 - 6ml PM16 中, 当细胞数在 Coulter Counter 中测定后, 调节至 10^7 个细胞/ml。

试验混合物包含 0.24ml 细胞悬浮液, 0.03ml 20mM CaCl₂/5 mM MgCl₂ 和 5 μ l 试验物质。在 37 $^{\circ}$ C 预培养 15 分钟后, 反应用 0.03ml A23187/谷胱甘肽 (100 μ g A23187/ml; 15.4 μ g 谷胱甘肽/ml) 开始。在 37 $^{\circ}$ C 下培养 5 分钟之后立即将样品冷至 0 $^{\circ}$ C 以下而终止。在 Eppendorf Centrifuge (0 $^{\circ}$ C) 离心分离 2 分钟后, 上层清液被除去并色谱检验。

高压液相色谱 (HPLC): HPLC 仪包含 Kratos 泵 (Spectro-flow 400) , 具有 75 μ l 样品环的冷却的自动 BT7041 样品注射器

(Biotronik), Nucleosil C18 柱 (100*3mm , 5 μ m Chrompack 颗粒), UV 检测器 (Kratos) Spectroflow 757 (波长: 280nm , 测量范围: 0.1AUFS, 时间常数: 0.5S) 和 Spectra Physics 积分仪 (SP4270) 。洗脱剂 (725ml 甲醇, 275ml 水和 0.1ml 乙酸) 以 0.7ml/分钟 的流速应用, 压力约 100bar 。

注: 在开始实际测量之前, 测量另外的对照样品已被发现是有用的。操作时, 已被设定的测量范围可被检查和改变, 如果需要的话。在细胞培养之前在特定试验浓度 (例如: 10^{-5} M) 在 PM16 中测量试验物质是极其重要的, 因为试验物质可能隐藏 LTB₄ 峰。如果这是事实, 必须选择更低的浓度。

试验 4, 刺激细胞因子释放

从人血分离单核细胞

用 1ml 3.8% 柠檬酸钠溶液稳定化的 10ml 人血用 10ml PM16 (Seva, Heichelberg) 稀释并用 15ml Lymphoprep (Dr. Molter GmbH, Heidelberg) 铺垫。样品在室温下在 $400 \times g$ (1600rpm, Minifuge 2, Heraeus, Osterode) 离心分离 40 分钟。单核细胞在 Lymphoprep/血浆界面可见为白色环状物。此环状物用注射器小心地取出, 用等体积的 PM16 稀释, 在 $400 \times g$ 离心分离 10 分钟。沉积物用约 10ml RPMI1640 (+ 300mg/l L - 谷酰胺, Gibco, Eggenstein) (Wallis, 1986) 洗涤。将细胞再悬浮于约 1ml RPMI 1640 (+ 300mg/l L - 谷酰胺 + 25mM HEPES + 100 μ g/ml 链霉素 + 100 μ g/ml 青霉素) 之后, 细胞密度用 Coulter Counter JT (Coulter Diagnostics) 测定并调至 5×10^6 个/ml。典型地, 细胞由 90% 淋巴细胞和 10% 单核细胞组成。

230 μ l 单核细胞在 37 $^{\circ}$ C; 5% CO₂, 用 10 μ l 试验物质 (10 μ M DMSO/水, 1/10) 和 10 μ l 脂多糖 (LPS; 在开始试验之前 500 μ g 溶于 1ml DMSO 中并用水稀释 1/10; 购自 Salmonella abortus equi, Sigma, Deisonhofen) 培养 20 - 22 小时 (在 IL - 6 的情况下 5 小时) 。样品在冰浴中冷至 0 $^{\circ}$ C, 在 Sigma 离心机 (2 分钟; 2000rpm) 上离心分离。上层清液的等分试样用 Elisa (Biermann,

Bad Nauheim) 测定。缩写 IL 代表白细胞介素而 TNF 代表肿瘤坏死因子 α 。

试验 5 环氧化酶 - 依赖的血小板聚集

富血小板血浆 (PRP): 为了抑制血凝固, 人血用其体积 1/10 的 3.8% 柠檬酸钠溶液处理。然后在 $105 \times g$ 离心分离 20 分钟, 然后上层清液 (PRP) 被除去。200 μ l PRP 在 37 $^{\circ}$ C, 与 30 μ l 试验物质在 PAP4 聚集计 (BioData) 中预培养 10 分钟。试验物质溶于有机溶剂并用缓冲溶液 (50mM TrisHCl, pH8.0; 90mM NaCl) 稀释。聚集用 20 μ l 诱导剂引发。在聚集期间, 以 800rpm 搅拌。二十碳四烯酸 (5mg/ml) 用作诱导剂。

试验 1 至 3 的结果概括在表 2 中。表中的值显示单位为 μ m 的试验物质浓度, 除此之外, 残留活性以基于被定为 100% 的对照为基础的百分数测量。白细胞介素另在试验 4 中指明。

表 2

实施例	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5
1			10 μM 92		10 μM 93
3					100 μM 98
5					100 μM 98
7					100 μM 95
8			10 μM 15 1 μM 93		100 μM 91
9	100 μM 64		10 μM 0 1 μM 59	IL-1 10 μM 73 IL-6 10 μM 93 TNF α 10 μM 63	100 μM 92
10			10 μM 20 1 μM 89	TNF α 10 μM 78	100 μM 98
13	100 μM 20 10 μM 77	25 μM 22 10 μM 65			10 μM 98
14					10 μM 100
18				IL-1 α 100 μM 36 10 μM 89	
19	100 μM 20 10 μM 78	10 μM 94			10 μM 100
20					10 μM 100
24				IL-1 10 μM 86	10 μM 94
25			10 μM 29 1 μM 85	IL-1 α 10 μM 62 IL β 10 μM 93 TNF α 10 μM 82	10 μM 86
26				TNF α 10 μM 88	10 μM 94
27					100 μM 97

实施例	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5
28	10 μ M 59 1 μ M 97	25 μ M 8 10 μ M 60	10 μ M 0 1 μ M 14	IL-1 α 10 μ M 93	10 μ M 93
31					100 μ M 100
32	100 μ M 34 10 μ M 72 1 μ M 84				
34					100 μ M 98
35				IL-1 α 10 μ M 84	100 μ M 94
36			10 μ M 93		100 μ M 87
38				IL-1 α 1 μ M 89 IL-1 β 1 μ M 85	100 μ M 90
39					100 μ M 98
41	100 μ M 78	50 μ M 36 5 μ M 75	10 μ M 13	TNF α 10 μ M 89	100 μ M 95
43			10 μ M 93		100 μ M 99
44					10 μ M 99
45					100 μ M 98
46				IL-1 α 1 μ M 77 IL-1 β 1 μ M 85 TNF α 10 μ M 79	100 μ M 90
47	100 μ M 17 10 μ M 38 1 μ M 85			IL-1 α 10 μ M 72 1 μ M 89 TNF α 10 μ M 64	
49	100 μ M 19 10 μ M 23 1 μ M 88	50 μ M 12 5 μ M 80	10 μ M 0 1 μ M 90	IL-6 1 μ M 91 TNF α 10 μ M 91	

实施例	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5
57					100 μ M 99
58					100 μ M 99
59	100 μ M 35 10 μ M 61 1 μ M 91	10 μ M 48 1 μ M 135			
60			10 μ M 88		
61	100 μ M 80		10 μ M 3	IL-1 α 1 μ M 94 TNF α 10 μ M 68	100 μ M 94
63	100 μ M 66 10 μ M 88	50 μ M 79	10 μ M 91	IL-1 α 10 μ M 75 IL-1 β 10 μ M 77	
64	100 μ M 72 10 μ M 96			IL-1 10 μ M 68 1 μ M 85 IL-1 10 μ M 82	100 μ M 97
70		10 μ M 22			
71	10 μ M 42 1 μ M 79				25 μ M 97
72	10 μ M 51 1 μ M 82				25 μ M 100
73		10 μ M 9 1 μ M 100			25 μ M 100
74	10 μ M 64				25 μ M 95
75	10 μ M 49 1 μ M 89				25 μ M 98
76	100 μ M 9 10 μ M 68				25 μ M 99
77	100 μ M 30 10 μ M 74				25 μ M 100
78					50 μ M 94
79					100 μ M 96

实施例	试验 1	试验 2	试验 3	试验 4	试验 5
80					50 μM 97
81					100 μM 100
82					100 μM 93
85					100 μM 94

该表用实施例 9) 解释:

64% 解蛋白活性 (试验 1) 在加入 100 μ l 抑制物质实施例 9) 之后稀释。没有抑制物质时, 相应于 100% 解蛋白活性可被释放。

结果: 根据本发明的化合物作为炎症抑制剂是活性的, 因为它在人体白细胞体系中作为解蛋白活性 (试验 1) 和活性氧 (试验 2) 的释放, 以及白细胞三烯 B₄ 合成 (试验 3) 的抑制剂显示可感受到的生物活性。在人体系统中各种细胞因子从单核细胞 (试验 4) 的释放也被抑制。尤其是, 化合物对环氧化酶 - 依赖的人血血小板体系 (试验 5) 没有抑制作用。因此, 可预计不会产生可归因于环氧化酶抑制的不希望的副作用 (延长出血时间, 胃肠溃疡和肾毒性)。

试验 6: 在辅助剂/关节炎模型中的抗关节炎试验

Wistar-Lewis 系雄性大鼠 (Mollegaard/Denmark) 被用作试验动物。体重在 160g 至 200g 之间。将 0.1ml Freund's 辅助剂 (= 每 ml 重白石蜡油 Merck, Darmstadt 6mg 乳酪分支杆菌悬浮液, Difco Lab. /Detroit, Mich. USA) Subplantar 注射到尾巴根部, 在实验的第 10 至 14 天, 导致免疫病理过程和慢性炎症, 特别是关节炎和关节周炎病症形式, 在身体的其它部位 (继发性损伤)。动物用购自 Altrogge, Lage 的标准食物 Altromin-R 随意喂养, 并供给自来水。从实验的第 14 天至实验结束, 动物被每 kg 给予作为止痛剂的 60mg 可德因。从辅助剂给药的那天开始, 每天 (共 17 天) 将试验物质以 CMC 悬浮液, 以注射体积 1ml/100g 体重口服给药。在实验的第一天和第 18 天, 每只后爪的体积, 和体重被测量。与未处理的对照组比较, 爪体积增加方面的缩减作为活性标准, 两只爪被平均。结果被概括于表 3 中。

试验 8: 抑制肿瘤细胞增殖

肿瘤细胞系 20 - 10 - 5S (杂交瘤细胞系, 由 ATCC (美国典型培养物保藏) 提供, 它产生抗鼠 T 细胞抗体) 被用于测定试验物质的抗增生性质。细胞在 37 $^{\circ}$ C 和 5% CO₂, 在无血清的条件下在 GC 介质 (细胞生长介质 = IScove - ATL (+清蛋白 + 铁传递

蛋白 + 类脂)；购自 Vitromex, Vilshofen) 中培养。只有对数生长期的细胞被用于试验混合物。试验物质以各种浓度 (从 1 至 50 μm)，与 4×10^3 20 - 10 - 5S 细胞一起吸入圆底微滴板 (介质总体积 200 μl)。培养 48 小时应 (37 $^{\circ}\text{C}$ 和 5 % CO_2)，25 μl 氘标记的胸苷 (= 0.25 μCi /试验混合物，比活性，23 Ci/mM) 被加入板中。在随后的 16 小时期间，放射活性标记的胸苷被掺入生长细胞的 DNA 中。样品在玻璃纤维滤膜上吸滤滤出，且掺入的放射活性用 β 计数器 (购自 Wallac 的 Beta Plate System 1205) 测量。以掺入的放射活性为基础， IC_{50} 值 (50 % 抑制浓度) 与正对照 (没有试验物质的试验混合物) 相比被计算，并被概括于表 3 中。

表3:

实施例	试验6	试验6	试验7	试验8
	剂量 (mg/kg)	爪体积 (% 抑制)	ED ₅₀ (mg/kg)	IC ₅₀ (μM)
1	50	70	10-50 i.d.	5-10
3				10
4				30
5			< 10 i.d.	
6			约 50 i.d.	
7			10-30 i.d.	
8	50	67	约 10 i.d.	< 5
9			约 50 i.d.	
11				< 5
12	50	82		10
13	50	84	约 50 i.d.	6.10
14			10-50 i.d.	
15	50	60		8-15
16				30
17				8-15
18				5-10
19	25	85		< 5
20	25	67	约 50 i.d.	< 5
22	50	74		
24	50	43		< 5
25	50	44	3-10 i.d.	< 5
26				< 5
27	50	71		< 5
28	50	74		< 5
29				< 5
30	50	63		5-10

实施例	试验 6	试验 6	试验 7	试验 8
	剂量 (mg/kg)	爪体积 (% 抑制)	ED ₅₀ (mg/kg)	IC ₅₀ (μM)
33				< 5
37				< 5
39				30
40			1-3 i.d.	< 5
41				< 5
42				5-10
44				5-10
45				5-10
47			10-50 i.d.	5-10
48	50	60	10-50 i.d.	5-10
49			约 50 i.d.	5-10
52			3-10 i.d.	< 5
53	25	48	10-50 i.d.	8-10
54			1-3 i.d.	5-10
55	50	47		< 5
56			约 50 i.d.	
57				< 5
59			1-3 i.d.	30
66	25	59		< 5
67	50	53		< 5
69	50	83		5-10
70	25	59		5
71	25	66		5-10
72	25	60		5-10
73	50	73		
74	25	60		5-10
75	25	76		5-10

实施例	试验 6	试验 6	试验 7	试验 8
	剂量 (mg/kg)	爪体积 (% 抑制)	ED ₅₀ (mg/kg)	IC ₅₀ (μM)
76	50	70		20
77	50	82		20
78				5-10
79				5-10
80				5-10
81	50	67		
83	50	39		
84	25	49		
85				< 5
86	20	70		< 5
87	20	50		< 5
88				10
89	50	36		20
90	50	36		30

< 意指小于